

NOVEL GLYCOSYLTRANSFERASE GENES

Publication number: WO2004018682

Publication date: 2004-03-04

Inventor: NAKAMURA NORIKO (JP); FUKUI YUKO (JP); ONO EIICHIRO (JP); TANAKA YOSHIKAZU (JP); OKUHARA HIROAKI (JP)

Applicant: SUNTORY LTD (JP); NAT AGRICULTURE AND BOI ORIENT (JP); NAKAMURA NORIKO (JP); FUKUI YUKO (JP); ONO EIICHIRO (JP); TANAKA YOSHIKAZU (JP); OKUHARA HIROAKI (JP)

Classification:

- International: C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N9/10; C12N15/29; C12N15/82; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N9/10; C12N15/29; C12N15/82; (IPC1-7): C12N15/29; A01H5/00; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N9/10

- european: C12N9/10D; C12N15/82C4B; C12N15/82C4B8

Application number: WO2003JP10500 20030820

Priority number(s): JP20020239743 20020820; JP20030085452 20030326

Also published as:

EP1544300 (A1)

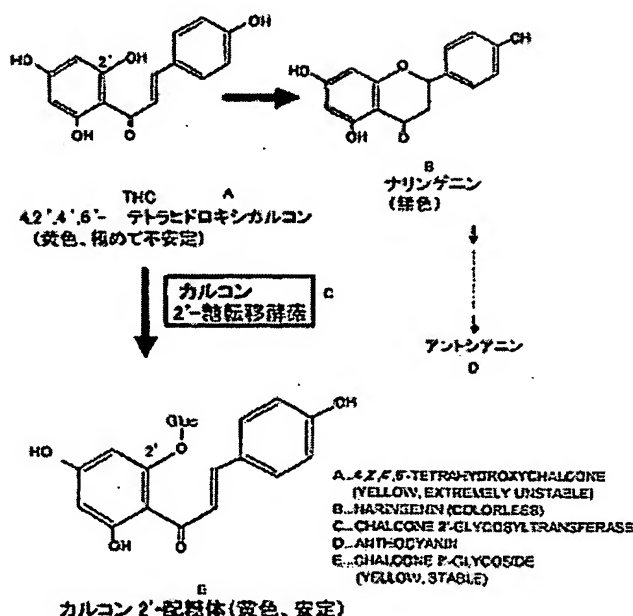
Cited documents:

EP1072684
WO0192509
XP002973931
XP002973932
XP002172234
XP002973933
less <<

Report a data error here

Abstract of WO2004018682

It is intended to provide enzymes which catalyze a reaction of transferring a sugar to the hydroxyl group at the 2'-position of a chalcone and genes thereof, preferably an enzyme which catalyzes a reaction of transferring glucose specifically to the hydroxyl group at the 2'-position of a chalcone and its gene. It is also intended to provide a plant having a flower color modified by using such a glycosyltransferase. From petal cDNA libraries of carnation and so on, several ten glycosyltransferases having base sequences corresponding to conserved regions are cloned with the use of probes corresponding to the conserved regions of the glycosyltransferases. Furthermore, these glycosyltransferases are expressed in Escherichia coli and an activity of transferring glucose to the 2'-position of a chalcone (i.e., chalcone 2'-glycosyltransferase activity) is confirmed in the E. coli extract. Thus, it is confirmed that the cloned genes encode 2'-glycosyltransferases.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 3 月 4 日 (04.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/018682 A1(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/29, A01H
5/00, C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, 9/108203 大阪府 大阪市北区 堂島浜 2 丁目 1 番 4 0 号
Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010500

(71) 出願人 (日本についてののみ): 生物系特定産業技術
研究推進機構 (BIO-ORIENTED TECHNOLOGY RE-
SEARCH ADVANCEMENT INSTITUTION) [JP/JP];
〒331-8537 埼玉県 さいたま市北区 日進町 1 丁目
4 0 番地 2 Saitama (JP).

(22) 国際出願日: 2003 年 8 月 20 日 (20.08.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

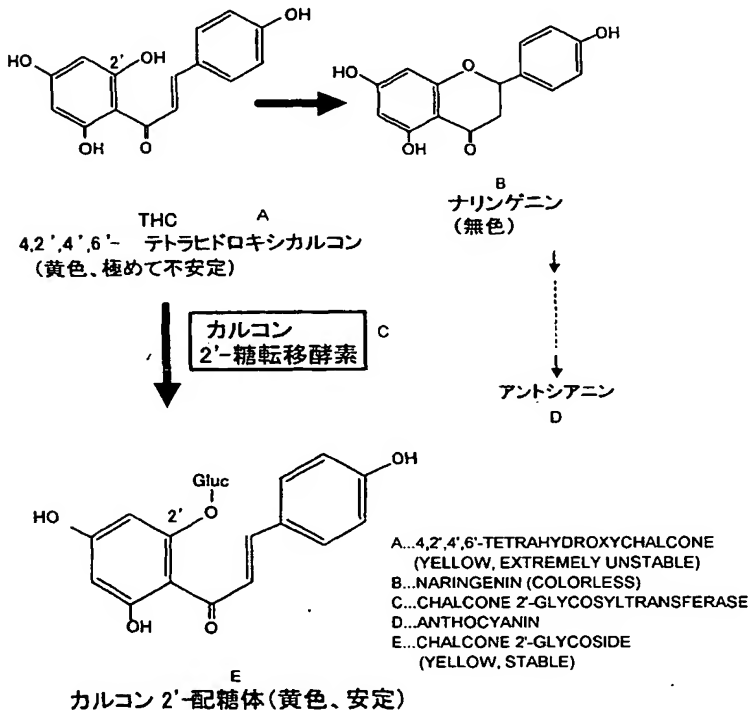
(72) 発明者; および

(30) 優先権データ:
特願2002-239743 2002 年 8 月 20 日 (20.08.2002) JP
特願2003-85452 2003 年 3 月 26 日 (26.03.2003) JP(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 中村 典子
(NAKAMURA, Noriko) [JP/JP]; 〒604-8456 京都府 京
都市中京区 西ノ京壺ノ内町 2-1 6 Kyoto (JP). 福
井 祐子 (FUKUI, Yuko) [JP/JP]; 〒618-0014 大阪府 三
島郡島本町 水無瀬 2 丁目 8-2-9 0 7 Osaka (JP).
小笠 栄一郎 (ONO, Eiichiro) [JP/JP]; 〒520-0844 滋
賀県 大津市 国分 2 丁目 9 3 1-3 Shiga (JP). 田中

[続葉有]

(54) Title: NOVEL GLYCOSYLTRANSFERASE GENES

(54) 発明の名称: 新規糖転移酵素遺伝子



(57) Abstract: It is intended to provide enzymes which catalyze a reaction of transferring a sugar to the hydroxyl group at the 2' -position of a chalcone and genes thereof, preferably an enzyme which catalyzes a reaction of transferring glucose specifically to the hydroxyl group at the 2' -position of a chalcone and its gene. It is also intended to provide a plant having a flower color modified by using such a glycosyltransferase. From petal cDNA libraries of carnation and so on, several ten glycosyltransferases having base sequences corresponding to conserved regions are cloned with the use of probes corresponding to the conserved regions of the glycosyltransferases. Furthermore, these glycosyltransferases are expressed in *Escherichia coli* and an activity of transferring glucose to the 2' -position of a chalcone (i.e., chalcone 2' -glycosyltransferase activity) is confirmed in the *E. coli* extract. Thus, it is confirmed that the cloned genes encode 2' -glycosyltransferases.

(57) 要約: 本発明は、カルコン類の 2' 位の水酸基に糖を転移する反応を触媒する酵素及びその遺伝子、好ましくはカルコン類の 2' 位の水酸基に特異的にグルコースを転移する反応を触媒する酵素及びその遺伝子を提供する。

さらに、本発明は、当該糖転移酵素遺伝子を用いて花色を改変させた植物体を提供する。カーネーション等の花卉 cDNA ライブラリーから糖転移酵素の保存領域に対応したプローブを用いて、当該保存領域に対応する塩基配列を有する糖転移酵素遺伝子を数十種クローン化した。さらに、当該糖転移酵素遺伝子群を各々大腸菌で発現させ、その中に、当該大腸菌の抽出液中にカルコンの 2' 位にグルコースを転移する活性、すなわちカルコン 2' 位糖転移酵素活性を確認し、クロー

[続葉有]



良和 (TANAKA, Yoshikazu) [JP/JP]; 〒520-0249 滋賀
県 大津市 仰木の里 2-7-4 Shiga (JP). 奥原 宏明
(OKUHARA, Hiroaki) [JP/JP]; 〒618-0022 大阪府 三島
郡 島本町 桜井 1-10-15 Osaka (JP).

(74) 代理人: 酒井 宏明 (SAKAI, Hiroaki); 〒100-0013 東京
都 千代田区 霞ヶ関三丁目 2 番 6 号 東京倶楽部ビル
ディング Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): JP, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

新規糖転移酵素遺伝子

5 技術分野

本発明はカルコン類に糖を転移する活性を有する酵素の遺伝子、および当該糖転移酵素を利用して花色が変換された植物に関するものである。更に詳しくは、カルコン類の2'位配糖体を合成する活性を有する酵素遺伝子、好ましくはカーネーションまたはシクラメン由来のカルコン類
10 の2'位配糖体を合成する活性を有する酵素遺伝子、及びその利用に関するものである。

背景技術

花色は人が花卉を鑑賞あるいは購入する際に重要な形質であり、古く
15 から様々な色の花が育種されてきた。単一の種ですべての色の花をもつ場合はむしろ稀であるが、これは花色として発現する色素（花色素）の生合成が遺伝的に規定されていることによる。交配育種では利用できる遺伝子資源が交配可能な近縁種に限定されているため、交配によって目的の種においてすべての色の花を作るとは実質的に不可能であった。
20 最近になって、遺伝子組換え技術を利用して、花色素の合成に係る酵素の遺伝子のある植物から取得し、当該遺伝子を別の種で発現することにより花の色を改変することが可能となった（例えば、非特許文献1、非特許文献2参照）。

花の色のうち、橙、赤、紫、青は主にアントシアニンと呼ばれるフラ
25 ボノイドに由来する。黄色は、カロチノイド、ベタレインといったフラボノイド以外の化合物に由来することが多いが、一部の植物種の黄色はフラボノイドに由来する。たとえば、黄色カーネーションには4, 2',

4', 6'-テトラヒドロキシカルコン（以下、「THC」とする。）
の2'位配糖体が花卉中に存在することが知られている（例えば、非特
許文献3参照）。カルコン類としては、THC、ブテイン、イソリクイ
チゲニン等の配糖体が知られており、カーネーション、アサガオ、ボタ
5 ン、アスター、ムギワラギクにはTHCが、キンギョソウやスターチス
には3, 4, 2', 4', 6'-ペンタヒドロキシカルコンが、コスモ
ス、キクイモにはブテインが、ダリアにはブテインおよびイソリクイ
チゲニンをアグリコンとする配糖体が含まれている。また、キンギョソウ
などの限られた種にはオーレウシジン、ブラックテアチンなどのオーロ
10 ン類と呼ばれる黄色の花色素が存在するが、オーロンの吸収極大は39
9 nmから403 nmであるのに対し、カルコンの吸収極大は365 nm
から382 nmであるから、両者の色調は異なる（例えば、非特許文
献4参照）。一般にカルコン類、オーロン類とも植物細胞中では糖転移
された配糖体になることにより安定化され液胞中に移行し蓄積される。
15 アントシアニンの生合成経路はよく研究されており、アントシアニンの
生合成に関与する酵素やそれらをコードする遺伝子が知られている（例
えば、非特許文献5参照）。また、オーロンの生合成に関わる酵素とそ
の遺伝子についても報告されている（例えば、非特許文献6参照）。

フラボノイドの生合成経路は高等植物には広く存在しており、また、
20 種間で共通している。THCは、3分子のマロニルCoAと1分子のク
マロイルCoAからカルコン合成酵素の触媒作用により生合成される。
図1に示すように、THCは薄い黄色を呈するが、植物においては、カ
ルコンイソメラーゼにより速やかに無色のナリングニンに変換される。
また、THCは中性付近のpHではきわめて不安定であり、自発的に閉
25 環してナリングニンに変換される。THCが植物細胞中で安定に存在す
る、すなわち黄色を安定に呈するためにはTHCの2'位に糖転移され、
液胞に輸送されることが必要であるとされている。したがって、THC

の2'位に糖転移する酵素の遺伝子を得ることができれば、この酵素遺伝子を植物において発現し、THC配糖体を蓄積させ、黄色の花を作成できると考えられていた（例えば、非特許文献7参照）。

しかしながら、THCをはじめ、カルコン類の2'位の水酸基に糖、
5 例えばグルコースを転移する反応を触媒する酵素の活性を測定することができなかった。従来カルコン糖転移酵素の活性測定には、UDP-グルコースを放射性同位元素で標識し、酵素反応後、生成した配糖体を酢酸エチル抽出した有機層の放射活性を測定するという方法（例えば、非特許文献8参照）が用いられていた。しかし、THCの配糖体はそのほとん
10 どが水層に移動するため、放射活性でカウントされていたのは未反応でわずかに有機層に溶出したフリーのUDP-グルコースの可能性が高く、本来のTHC糖転移酵素活性を正確に測定できないという問題があった。従って、この糖転移反応を触媒する酵素が精製できなかったの
で、当該糖転移酵素をコードする遺伝子がクローン化できなかった。

15 THCの2'位の水酸基がメチル化された化合物が蓄積した場合も、花卉は淡い黄色となることは知られているが、このメチル化を触媒する酵素やその遺伝子については知られていない。ダリア、コスモスなどの黄色の品種には6'-デオキシカルコンが含まれる。マメ科植物においては、6'-デオキシカルコンは5'-デオキシフラボノイドの前駆体
20 あり、カルコンシンターゼ（CHS）とカルコンリダクターゼ（CHR）の触媒作用により生合成される。ペチュニアにアルファルファのCHR遺伝子を導入したところ、ブテインなどの6'-デオキシカルコン類が生成したことが報告されているが、当該CHR遺伝子を白い花をもつ
25 ペチュニアに導入した場合、つぼみの段階ではごく薄い黄色が見られたが、開花時にはほとんど白であり、産業上有用な黄色の花を作出するに至らなかった（例えば、非特許文献9参照）。

フラボノイドをはじめ多様な花色素化合物の糖転移反応を触媒して配

糖体を生成する酵素は、糖転移酵素と呼ばれ、植物はアグリコン及び転移する糖の種類に特異性を有する多様な分子種の糖転移酵素およびそれらをコードする遺伝子を持っている。グルコース転移酵素は通常UDP-グルコースをグルコース供与体として利用するので、グルコース転移酵素はそのアミノ酸配列中にUDP-グルコースに結合するモチーフを含んでいる（例えば、非特許文献10参照）。このモチーフを有する糖転移酵素の遺伝子は、すでにゲノムの全構造が明らかになっているアラビドプシスには、99種あることが知られている（例えば、非特許文献11参照）。また、いくつかの糖転移酵素のアミノ酸配列と機能が解明されている。フラボノイドあるいはアントシアニジンの3位の水酸基にグルコースを転移する反応を触媒する酵素（UDP-グルコース：フラボノイド3-グルコシルトランスフェラーゼ）の遺伝子は、トウモロコシ、リンドウ、ブドウなどから得られている（例えば、非特許文献11参照）。また、アントシアニンの5位の水酸基にグルコースを転移する反応を触媒する酵素（UDP-グルコース：アントシアニン5-グルコシルトランスフェラーゼ）の遺伝子は、シソ、バーベナなどから得られている（例えば、非特許文献12参照）。

これらのグルコース転移酵素のアミノ酸配列の解析から、グルコース転移反応を触媒するという同一機能を有するタンパク質は植物種が異なってもアミノ酸配列は類似していること、すなわちファミリーを形成することが知られている（例えば、非特許文献11参照）。つまり、すでにアミノ酸配列とグルコース転移反応を触媒することが明らかとなっているグルコース転移酵素と同一機能を有する酵素（オルソログ）を他の植物種から得ることについては報告がある。たとえば、ペチュニアのUDP-グルコース：アントシアニン5-グルコシルトランスフェラーゼの遺伝子は、シソのUDP-グルコース：アントシアニン5-グルコシルトランスフェラーゼの遺伝子を用いてクローニングされた（例え

ば、非特許文献 1 3 参照)。しかしながら、現在の技術水準からしても、アミノ酸配列あるいは機能の明らかではない糖転移酵素の遺伝子を取得することには、多大の試行錯誤と困難が伴う。特に、アラビドプシスの花は白であり、カルコン 2' 位配糖体の蓄積は報告されていない。したがって、すでにゲノム構造が決定されているアラビドプシスの糖転移酵素遺伝子の情報を利用して本遺伝子のクローニングを行うことはできない。カーネーションに関しては、カルコンイソメラーゼとジヒドロフラボノール還元酵素遺伝子に変異が生じた際に T H C 配糖体が蓄積し黄色を呈することが報告されている。また、シクラメンにおいてはカルコンイソメラーゼの変異により T H C 配糖体が蓄積すると考えられている。同様にカルコン 2' 位配糖体が蓄積する植物としてはペチュニア花粉、シャクヤク、ムギワラギク、エゾギク、シクラメン、ツキミソウ、ニチニチソウなどが知られており、また、多くの植物、特に薄い黄色の花を呈する植物にも T H C の 2' 位に糖を転移する酵素の遺伝子が発現していると考えられる。

非特許文献 1 ; Plant Cell Physiol. 39, 1119(1998)

非特許文献 2 ; Curr. Opin. Biotechnol. 12, 155(2001)

非特許文献 3 ; Phytochemistry, 5, 111(1996)

非特許文献 4 ; バイオホルティ 1 49-57(1990)誠文堂新光社

非特許文献 5 ; Comprehensive Natural Products Chemistry, vol I(ed. Sankawa)pp713-748, Elsevier, Amsterdam(1999)

非特許文献 6 ; Science, 290, 1163(2000)

非特許文献 7 ; Biotechnology of Ornamental Plants(Edited by Geneve, Preece and Merkle)pp259-294, CAB International Wallingford, UK (1997)

非特許文献 8 ; Phytochemistry, Vol. 17, pp. 53-56, (1978)

非特許文献 9 ; Plant J. 13, 259(1998)

非特許文献 10 ; Plant Physiol. 112, 446 (2001)

非特許文献 11 ; J. Biol. Chem. 276, 4338, (2001)

非特許文献 12 ; J. Biol. Chem. 274, 7405, (1999)

非特許文献 13 ; Plant Mol Biol. 48, 401-11 (2002)

5

発明の開示

本発明は、カルコン類の 2' 位の水酸基に糖を転移する反応を触媒する酵素及びその遺伝子、好ましくはカルコン類の 2' 位の水酸基に特異的にグルコースを転移する反応を触媒する酵素及びその遺伝子を提供する。さらに本発明は当該糖転移酵素遺伝子を用いて花色を改変、好ましくは黄色に変化させた植物体を提供する。

10

前述のように、カルコン 2' 位糖転移酵素の性質は知られておらず、酵素が精製されたり、その遺伝子がクローニングされたこともなかった。発明者らは、カーネーションの花弁 cDNA ライブラリーから糖転移酵素の保存領域に対応したプローブを用いて、当該保存領域に対応する塩基配列を有する糖転移酵素遺伝子を数十種クローン化した。さらに、当該糖転移酵素遺伝子群を各々大腸菌で発現させ、その中に、当該大腸菌の抽出液中にカルコンの 2' 位にグルコースを転移する活性、すなわちカルコン 2' 位糖転移酵素活性を確認し、クローン化した遺伝子が 2' 位糖転移酵素をコードすることを確認して、本発明を完成した。

15

20

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列に対して 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換及び／若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつカルコン類の 2' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、

25

(2) 配列番号 1 に記載する塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリジェントな条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の

2' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、

(3) 配列番号 15 に記載のアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列に対して 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換及び／若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつカルコン類の 2' 位に糖を転移する活

5 性を有するタンパク質をコードする遺伝子、

(4) 配列番号 14 に記載する塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリジェントな条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の 2' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、

(5) 配列番号 17 に記載のアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列に対して 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換及び／若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつカルコン類の 2' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、

(6) 配列番号 16 に記載する塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリジェントな条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の 2' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、

(7) 配列番号 19 に記載のアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列に対して 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換及び／若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつカルコン類の 2' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、

(8) 配列番号 18 に記載する塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリジェントな条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の 2' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、

(9) 配列番号 21 に記載のアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列に対して 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換及び／若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつカルコン類の 2' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、

(10) 配列番号 20 に記載する塩基配列と相補的な塩基配列からな

るDNAとストリジェントな条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の2'位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、

- (11) 配列番号56に記載のアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列に対して1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換及び／若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつカルコン類の2'位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

(12) 配列番号55に記載する塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリジェントな条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の2'位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

- 10 (13) 前記(1)から(12)のいずれか一項に記載の遺伝子を含んでなるベクター。

(14) 前記(13)に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。

- 15 (15) 前記(14)に記載の宿主細胞を培養又は生育させ、当該宿主細胞からカルコン類の2'位に糖を転移する活性を有するタンパク質を採取することを特徴とする当該タンパク質の製造方法。

(16) 前記(15)に記載の方法で得られたタンパク質。

- 20 (17) 前記(1)から(12)のいずれか一項に記載の遺伝子が導入された植物体若しくは当該植物体の子孫となる植物体、又はそれら植物体の組織。

(18) 前記(17)に記載の植物体から採取された切り花。

(19) 前記(1)から(12)のいずれか一項に記載の遺伝子を植物体に導入及び発現して花色が改変された植物体、及び当該植物体の子孫となる植物体。

- 25 (20) 改変された花色が黄色であることを特徴とする前記(18)に記載の植物体。

本発明により新規な遺伝子および酵素等が提供され、カルコン類の2

’ 位の水酸基に特異的に糖を転移させることができ、カルコン類を安定化させることができる。本発明は、花色を改変させた植物体の作製に好適に用いられる。

5 図面の簡単な説明

第 1 図は、カルコン 2’ 位糖転移酵素によるカルコン 2’ 位配糖体の合成経路を示す図である。

第 2 図は、植物由来の糖転移酵素のアミノ酸の配列のアライメントを示す図である。矢印で示した部分のアミノ酸配列に相当する塩基配列を
10 プライマーとして用いた。これらにより増幅される部分を G T 保存領域として実施例 2 のプローブに用いた。四角で囲んだ部分は各 G T 間の配列に相同性のある部分である。略号は、次の通りである。MG 3 G G T : アサガオ 3 G G T ; G G T 7 : リンドウ 3 G T ; H G T 8 : バーベナ 5 G T ; S b U F G T : コガネバナ G T。

15

発明を実施するための最良の形態

本発明の遺伝子としては、例えば配列番号 2、15、17、19、21、56 のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードするものが挙げられる。しかしながら、複数個のアミノ酸の付加、欠失または他のアミノ酸
20 に置換されたアミノ酸配列を有するタンパク質も、もとのタンパク質と同等の酵素活性を維持することが知られている。従って本発明は、カルコン 2’ 位糖転移酵素活性を保持しているタンパク質である限り、配列番号 2、15、17、19、21、56 に記載のアミノ酸配列に対して 1 個または複数個のアミノ酸配列の付加、欠失および／または他のアミ
25 ノ酸に置換されたアミノ酸配列を有するタンパク質および当該タンパク質をコードする遺伝子も本発明に属する。なお、複数個とは、2～30 個、好ましくは 2～9 個をいう。

本発明はまた、配列番号 1、14、16、18、20、55 のいずれかに記載の塩基配列と相補的な塩基配列を有する DNA に対し、ストリンジेंटな条件下でハイブリダイズし、かつカルコン 2' 位糖転移酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子に関するものである。すなわち、配列番号 1、14、16、18、20、55 のいずれかに記載の塩基配列と相補的な塩基配列を有する DNA に対しストリンジेंटな条件でハイブリダイズし、かつカルコン 2' 位糖転移酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子も、本発明の技術的範囲に属する。ハイブリダイゼーションの条件はプローブに用いる DNA の長さ及び塩基組成によって異なるから、以下に数値によって示す具体的な条件に限定されるものではないが、ここでいう「ストリンジेंटな条件」とは、例えば、好ましくは $5 \times \text{SSC}$ 、 37°C 、より好ましくは $5 \times \text{SSC}$ 、 50°C 、さらに好ましくは $2 \times \text{SSC}$ 、 65°C である。ここで、 $5 \times \text{SSC}$ 、 37°C の条件は、実施例 2 に示すように、アントシアニン類の糖転移酵素遺伝子の保存領域をプローブとして、本発明のカルコン 2' 位糖転移酵素のようなホモログとハイブリダイズさせる条件として好ましく適用でき、 $5 \times \text{SSC}$ 、 50°C の条件は、本発明のカーネーション由来のカルコン 2' 位糖転移酵素遺伝子をプローブとして他起源のカルコン 2' 位糖転移酵素遺伝子（オルソログ）をハイブリダイズさせる条件として好ましく適用できる。

上述のようなハイブリダイゼーションによって選択される遺伝子としては、天然由来のもの、例えば植物由来のもの、例えばシクラメン由来の遺伝子が挙げられるが、植物由来に限定されるものではない。すなわち、本発明のカルコン 2' 位糖転移酵素遺伝子は、カーネーション由来のカルコン 2' 位糖転移酵素遺伝子に限定されるものではなく、当該遺伝子のオルソログであるシクラメン、シャクヤクなどのカルコン類の 2' 位配糖体を含む植物に由来するカルコン 2' 位糖転移酵素遺伝子であ

ってもよく、当該遺伝子のいずれでも黄色の花を育種するのに用いることができる。また、ハイブリダイゼーションによって選択される遺伝子は cDNA であってもよく、ゲノム DNA であってもよい。

糖転移酵素の保存領域の相同性を有する遺伝子は実施例に示すように、

5 例例えばカーネーション花卉から作成した cDNA ライブラリーのスクリーニングによって得られる。また、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列が改変されたアミノ酸配列を有する糖転移酵素をコードする DNA は、配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA を用いて、公知の部位特定変異誘発法や PCR 法によって合成することができる。また、配列番号 1

10 5 に記載のアミノ酸配列が改変されたアミノ酸配列を有する糖転移酵素をコードする DNA は、配列番号 14 に記載の塩基配列を有する DNA を用いて、公知の部位特定変異誘発法や PCR 法によって合成することができる。また、配列番号 17 に記載のアミノ酸配列が改変されたアミノ酸配列を有する糖転移酵素をコードする DNA は、配列番号 16 に記

15 載の塩基配列を有する DNA を用いて、公知の部位特定変異誘発法や PCR 法によって合成することができる。また、配列番号 19 に記載のアミノ酸配列が改変されたアミノ酸配列を有する糖転移酵素をコードする DNA は、配列番号 18 に記載の塩基配列を有する DNA を用いて、公知の部位特定変異誘発法や PCR 法によって合成することができる。また、配列番号 21 に記載のアミノ酸配列が改変されたアミノ酸配列を有する糖転移酵素をコードする DNA は、配列番号 20 に記載の塩基配列を有する DNA を用いて、公知の部位特定変異誘発法や PCR 法によっ

20 て合成することができる。また、配列番号 56 に記載のアミノ酸配列が改変されたアミノ酸配列を有する糖転移酵素をコードする DNA は、配列番号 55 に記載の塩基配列を有する DNA を用いて、公知の部位特定変異誘発法や PCR 法によって合成することができる。例えばアミノ酸配列を改変したい DNA 断片を cDNA またはゲノム DNA の制限酵素

処理によって得、これを鋳型にして、所望のアミノ酸配列の改変に対応したプライマーを用い、部位特異的変異誘発またはPCR法を実施し、所望のアミノ酸配列の改変に対応したDNA断片を得ることができる。その後、この改変を導入したDNA断片を目的とする酵素の他の部分をコードするDNA断片と連結すればよい。

あるいはまた、短縮されたアミノ酸配列からなる酵素をコードするDNAを得るには、例えば目的とするアミノ酸配列より長いアミノ酸配列、例えば全長アミノ酸配列をコードするDNAを所望の制限酵素により切断し、その結果得られたDNA断片が目的とするアミノ酸配列の全体をコードしていない場合は、不足部分のアミノ酸配列に対応するDNA断片を合成し、連結すればよい。

このようにして得られた糖転移酵素遺伝子が大腸菌又は酵母での遺伝子発現系を用いて発現させ、当該大腸菌又は酵母の抽出液中のカルコン2'位糖転移酵素の活性を測定することにより、得られた糖転移酵素遺伝子がカルコン2'位糖転移活性を示すタンパク質をコードすることを確認することができる。カルコン2'位糖転移酵素の活性は、例えば実施例5に記載したように、ゲル濾過樹脂にカルコン2'位糖転移酵素の基質となるカルコン類を吸着させた後、当該ゲル濾過樹脂を糖転移酵素遺伝子で形質転換した大腸菌又は酵母の抽出液と反応させ、生成したカルコン2'位配糖体を高速液体クロマトグラフィーで分析することにより測定できる。

さらに、得られたカルコン2'位糖転移酵素遺伝子を適切な宿主細胞で発現させることにより、当該遺伝子の産物であるカルコン2'位糖転移酵素タンパク質を得ることができる。あるいはまた、例えば配列番号2に記載のアミノ酸配列の全部又は一部を有するタンパク質又はペプチドに対する抗体を用いて他の生物由来のカルコン2'位糖転移酵素遺伝子を発現クローニングによって得ることもできる。配列番号15、17、

19、21、56のアミノ酸配列に関しても同様である。

本発明はまた、カルコン2'位糖転移酵素遺伝子を含む組換えベクター、特に発現ベクター、及び当該ベクターによって形質転換された宿主細胞に関するものである。宿主としては、原核生物または真核生物を用いることができる。原核生物としては細菌、例えばエシェリヒア (*Escherichia*) 属に属する細菌、例えば大腸菌 (*Escherichia coli*)、バチルス (*Bacillus*) 属細菌、例えばバチルス、スブチリス (*Bacillus subtilis*) など従来公知の宿主細胞を用いることができる。真核細胞としては、例えば真核微生物、好ましくは酵母または糸状菌が使用できる。酵母としては例えばサッカロミセス、セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等のサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属酵母が挙げられ、また糸状菌としては、例えばアスペルギルス、オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス、ニガー (*Aspergillus niger*) 等のアスペルギルス (*Aspergillus*) 属糸状菌、及びペニシリウム (*Penicillium*) 属糸状菌等が挙げられる。さらに動物細胞または植物細胞も宿主細胞として使用でき、動物細胞としては、マウス、ハムスター、サル、ヒト等の細胞系が使用される。さらに昆虫細胞、例えばカイコ細胞、またはカイコの成虫それ自体も宿主として使用される。

本発明の発現ベクターはそれらを導入すべき宿主の生物種に依存したプロモーターおよびターミネーター等の発現制御領域、及び複製起点等を含む。細菌用、特に大腸菌における発現ベクターのプロモーターとしては、従来公知のプロモーター、例えば *trc* プロモーター、*tac* プロモーター、*lac* プロモーター等が使用できる。また、酵母用プロモーターとしては、例えばグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター、*PHO5* プロモーター等が使用され、糸状菌用プロ

モーターとしては例えばアミラーゼ、*trpC*等のプロモーターが使用できるが、これらのプロモーターに限定されるものではない。また動物細胞用プロモーターとしてはウイルス性プロモーター、例えばSV40アーリープロモーター、SV40レートプロモーター等が使用される。

- 5 発現ベクターの作成は制限酵素、リガーゼ等を用いて常法に従って行うことができる。また、発現ベクターによる宿主細胞の形質転換も従来公知の方法に従って行うことができる。

- 植物の発現ベクターの構築は、例えばアグロバクテリウムを用いる場合にはpBI121などのバイナリーベクターを、パーティクルガンを用いる場合にはpUC19などの大腸菌ベクターを用いることができる。
- 10 さらに、当該植物の発現ベクターで形質転換された植物細胞を例えば抗生物質耐性遺伝子などのマーカー遺伝子を用いて選抜し、適切な植物ホルモン等の条件を用いて再分化させ、カルコン2'位糖転移酵素遺伝子で形質転換された植物体を得ることができる。当該形質転換植物を栽培
- 15 することにより、開花させ、花色が改変された植物体を得ることができる。

- 発現ベクターによって形質転換された宿主細胞又は形質転換植物体を培養又は栽培し、培養物または植物体等から常法に従って、例えば、濾過、遠心分離、細胞の破碎、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換
- 20 クロマトグラフィー等により目的とするカルコン2'位糖転移酵素を回収、精製することができる。

- 本発明はカーネーション、シクラメンのカルコン2'位糖転移酵素遺伝子のみに限定されるものではなく、カルコン2'位糖転移酵素遺伝子の起源としては、植物でも動物でも微生物であってもよく、当該遺伝子がコードするタンパク質がカルコン2'位糖転移活性を有していれば同様に花色変換へ利用できる。本発明はまた、カルコン2'位糖転移酵素
- 25 遺伝子の利用に関するものであり、カルコン2'位糖転移酵素遺伝子を

植物体に導入および発現することにより、花色が改変された植物体もしくはその子孫の植物体又はこれら植物体の組織も本発明の技術的範囲であり、組織の形態としては切り花であってもよい。

現在の技術水準をもってすれば、植物に遺伝子を導入し、その遺伝子を
5 構成的あるいは組織特異的に発現させることは可能であるし、またアンチセンス法やコサプレッション法などによって目的の遺伝子の発現を抑制することも可能である。形質転換可能な植物の例としては、バラ、キク、カーネーション、金魚草、シクラメン、ラン、トルコギキョウ、フリージア、ガーベラ、グラジオラス、カスミソウ、カランコエ、ユリ、
10 ペラルゴニウム、ゼラニウム、ペチュニア、トレニア、チューリップ、イネ、オオムギ、小麦、ナタネ、ポテト、トマト、ポプラ、バナナ、ユーカリ、サツマイモ、タイズ、アルファルファ、ルーピン、トウモロコシ、カリフラワー、ニチニチソウなどがあげられるがこれらに限定されるものではない。

15 また、花色を改変させる方法の他の実施形態としては、上記のように本発明のカルコン 2' 位糖転移酵素遺伝子を導入すると共に、併せて T H C がカルコン 2' 位配糖体以外の物質に転換される代謝を抑制するような手段を採ることもできる。例えば、本発明のカルコン 2' 位糖転移酵素遺伝子を導入すると共に、C H I 遺伝子 (EMBO J 7,1257(1988))、
20 ペチュニアのフラバノン 3 水酸化酵素遺伝子 (F 3 H) (Britsh et al. (1993) European J. Biochemistry 217, p745-754)、ジヒドロフラボノール 4 還元酵素遺伝子 (D F R) (Beld et al. (1989) Plant Molecular Biology 13, p491-502, Huits et al. (1994) Plant J. 6, p295-310) などの遺伝子群から選ばれる 1 種または 2 種以上の遺伝子の発現を抑制する
25 形態を採用してもよい。

実施例

以下実施例に従って、発明の詳細を述べる。分子生物学的手法はとくに断らない限り、WO 96 / 2 5 5 0 0 号公報あるいはMolecular Cloning (Sambrook et. al. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989) に記載されている方法に従った。

5

実施例 1 カーネーション花卉 cDNA ライブラリーの構築

黄色のカーネーションの新鮮な花卉 5 g から、R. M c G o o k i n らの Method in Molecular Biology vol. 2 (Humana Press Inc. 1984) に詳細に示されているチオシアン酸グアニジン・塩化セシウムを用いる方法
10 で RNA を取得し、オリゴデックス d T 3 0 (日本ロシュ社) を用いて poly A + RNA を精製した。この poly A + RNA から、c D N A s y n t h e s i s K i t (S t r a t a g e n e 社) および λ Z A P I I U n i - X R v e c t o r k i t (S t r a t a g e n e 社) を用いて、c D N A ライブラリーを構築した。得られたライブラリーは、 1.6×10^5 プラーク・フォーミング・ユニット (p l a q u e f o r m i n g u n i t) からなっていた。

15

実施例 2 完全長カルコン 2' 位糖転移酵素遺伝子の取得

図 2 に示した、糖転移酵素 (G T) のアミノ酸配列を比較し得られた
20 保存領域 (図 2 中、対合する矢印で示した領域) に相当する塩基配列からなる DNA 断片を増幅し、これをプローブとして実施例 1 で述べたカーネーション cDNA ライブラリーをスクリーニングした。アミノ酸配列を比較した G T はアサガオ由来の UDP-グルコース : アントシアニン 3-グルコシド糖転移酵素 (3 G G T) (配列番号 1 3 に記載のア
25 ミノ酸配列)、リンドウ由来 UDP-グルコース : アントシアニン 3-グルコシルトランスフェラーゼ (3 G T) (P l a n t C e l l P h y s i o l . 3 7 , p p . 7 1 1 (1 9 9 6))、バーベナ由来 UD

25

P-グルコース：アントシアニン 5-グルコシルトランスフェラーゼ (5GT) (J. Biol. Chem., 274, 7405, (1999))、コガネバナ糖転移酵素 (GT) (Planta 210, 1006-1013 (2000)) 記載のアミノ酸配列の 4 種である。それぞれ GT について、図 2 の逆方向の矢印で示した保存領域を増幅できるオリゴヌクレオチドを作製し、DIG 標識システム (ロシュ・

5 ダイアグノスティックス社) にて製造者が推奨する条件に従い PCR によりラベルした。この際、鋳型として 1 ng のそれぞれの cDNA を含むプラスミド、プライマーとして各 100 ng の以下のオリゴヌクレオチドを使用し、95℃ 1 分、55℃ 1 分、72℃ 2 分からなる反応を 1

10 サイクルとし、25 サイクルを行った。これらの PCR 増幅産物を等量混合したものをハイブリダイゼーションのプロープとして、実施例 1 に記載のカーネーション由来の cDNA ライブラリーをスクリーニングした。保存領域の増幅に使用したプライマーは以下のとおりである。

オリゴヌクレオチド配列

15 アサガオ 3GT

配列番号 3 : 5'-GAA ATG GTC GGA TTG GCT GGG-3'

配列番号 4 : 5'-ACC TCC ACC CCA ACT TTC AGG-3'

リンドウ 3GT

配列番号 5 : 5'-TGC CTC AAA TGG CTT CAA ACT-3'

20 配列番号 6 : 5'-CCA CCT TTC ACC CCA ACC CC-3'

バーベナ 5GT

配列番号 7 : 5'-TGC CTC GAA TGG TTG AGC ACG-3'

配列番号 8 : 5'-CTC TCA CTC TCA CAC CCG-3'

コガネバナ GT

25 配列番号 9 : 5'-CAC GAA TGC TTA GCA TGG CTC-3'

配列番号 10 : 5'-CTT ATT GCC CAC TGA AAC CCC-3'

ライブラリーのスクリーニングはノンラジオシステム DNA 検出キッ

ト（ロッシュ・ダイアグノスティック社製）を用いて行った。ハイブリダイゼーションは、1% SDS、30%ホルムアミドを含む5×SSC
中で37℃で一夜行い、フィルターの洗浄は1×SSC、1% SDSを
用いて55℃で30分間行った。約27万プラークをスクリーニングし、
5 最終的に約30の糖転移酵素遺伝子を含むクローンを得た。このクロー
ンの中から、実施例4及び実施例5に記載した方法でカルコン2'位糖
転移活性を確認できたクローンが1つ得られ、該クローンをT170と
名づけ全塩基配列を決定した。塩基配列の決定は合成オリゴヌクレオチ
ドプライマーによるプライマーウォーキング法により行い、DNA S
10 e q u e n c e r m o d e l 3 1 0 0 (A p p l i e d B i o s
y s t e m s 社)を用いて決定した。塩基配列と当該塩基配列がコード
するアミノ酸配列を配列番号1及び2に、それぞれ示した。

実施例3 カルコン2'位糖転移酵素T170のアミノ酸配列解析

15 p T 1 7 0 は、490アミノ酸からなる分子量54.2 kDaのタン
パク質をコードする1709bpの遺伝子T170を含んでいた。T1
70がコードするアミノ酸配列を、すでに報告のある糖転移酵素と比較
したところリビングストーンデージー由来GT (Plant J. 19, 509 (1999))
と25%、シソ、バーベナ由来5GTと21%の相同性を示した。使
20 用したソフトウェアはMacVector ver. 6.0 (Oxfo
rd M o l e c u l e 社)に含まれるClustalWで、条件は、
Matrix B l o s u m : 3 0、k e t u p l e : 1、G a p p
e n a l t y : 3、T o p d i a g o n a l s : 5、W i n d o w S
i z e : 5で行った。BLAST検索（検索はデフォルトの条件で実施
25 した。すなわち、C o m p o s i t i o n - b a s e d s t a t i s
t i c s は、o n、C h o o s e f i l t e r はL o w c o m p l
e x i t y、M a t r i x はB l o s u m 6 2、G a p c o s t s は

Existence : 11 Extension : 1) では多くのGT
に対してホモロジーを示した。たとえば、リビングストーンデージー由
来ベタニジン6GT (Planta Vol.214, pp.492(2002)) に対して55%、
5 557、Eur. J. Biochem. Vol. 268, pp. 408
6 (2001)) に対して45%、タバコNTGT3 (アクセション番
号AB072918) に対して44%のアミノ酸配列の相同性を示した。

同じ機能、活性を有する酵素はアミノ酸配列が類似しており、ファミ
リーを形成することが知られているが、GTにおいても、図2に示した
10 アサガオ由来の3GGT、リンドウ由来の3GT及びバーベナ由来の5
GT及びコガネバナGTはファミリーを形成する。本発明のカルコン2
'位糖転移酵素のアミノ酸配列はこれら4種のGTのアミノ酸配列とは
低いホモロジーしか示さず、このファミリーには属さない。また、上記
15 のリビングストーンデージー由来ベタニジン6GT、サリチル酸などで
誘導されるタバコGT及びタバコNTGT3には比較的高いホモロジー
を示したが、これらのGTにカルコン糖転移活性は確認されていない。

実施例4 大腸菌におけるT170遺伝子の発現

T170遺伝子の大腸菌での発現は、The QIA expres
20 sionist (QIAGEN社) を用いて行った。まずT170上の
糖転移酵素遺伝子の開始コドンの5'側にNcoI認識配列を導入する
ために、以下に示す2種のプライマーT170-NcoIおよびM13
M4 を用いてPCR反応を行った。

T170-NcoI(配列番号11): 5'-AGT TCA ACC ATG GGC AAA GCA C-3'
25 M13 M4(配列番号12): 5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3'

PCR反応液(25 μ l)は、T170 100ng, 1xEx-T
aq buffer (Takara社), 0.2mM dNTPs, プ

ライマー各 0.2 pmol/μl, Ex-Taq polymerase 1.25 U からなる。反応は、94℃で5分反応させた後、94℃、1分、55℃、1分、72℃、2分の反応を25サイクル行い、最後に72℃で7分間処理した。得られたPCR産物をPCR 2.1 TOP

5 O vector (INVITROGEN社) に製造者が推奨する方法でサブクロニングした。このようにして得られたプラスミド pTOP

O-T170 とした。PCR 反応によるエラーがないことを塩基配列を決定することにより確認した。pQE60 (QIAGEN) を NcoI と BglII で消化した後、同部位に相補的プライマー pQE61-f

10 と pQE61-r をアニーリングさせたオリゴヌクレオチドカセットを挿入して、新たに MCS を導入したベクター pQE-61 を作製した。

(pQE61-f) 5'-CATGGGAGGTACCACTAGTGATATCA-3' (配列番号 36)

(pQE61-r) 5'-GATCTGATATCACTAGTGGTACCTCC-3' (配列番号 37)

pTOP O-T170 を NcoI、KpnI および PstI で制限酵

15 素処理し得られた約 1.8 Kb のフラグメントをベクター pQE-61 の NcoI と KpnI 切断部位に連結し、プラスミド pSB1443 を得た。pSB1443 で Competent high JM109 (TOYOBO 社) を形質転換した。

20 実施例 5 T170 cDNA 組換えタンパク質の糖転移酵素活性の測定

実施例 4 にて得られた大腸菌形質転換株を、アンピシリン 50 μg / ml を含む LB 培地 3 ml で 37℃ で一晩振とう培養した。そのうち 200 μl をアンピシリン 50 μg / ml、カザミノ酸 0.5% を含む

25 M9 培地 10 ml に加え A600 = 0.6 ~ 1.0 に達するまで培養した後、IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) を終濃度 0.02 mM になるよう加え、さ

らに 27℃で一晩振とう培養し、冷却遠心(3000 rpm、10分間、4℃)により集菌した。菌体を10 mlの緩衝液(30 mM

Tris-HCl pH 7.5、30 mM NaCl)に懸濁し、超音波処理により大腸菌を破碎した後、遠心分離(15,000 rpm、10分、4℃)を行い、得られた上清を粗酵素液とし、以下の活性測定に用いた。

THC(500 µg/ml エタノール溶液)を蒸留水で平衡化したゲル濾過樹脂、TOYOPEARL HW-40F(TOSOH社) 1 mlに蒸留水3 mlで希釈しながら負荷した後、水洗した。この樹脂100 µlに粗酵素液200 µlおよび5 mM UDP-glucose 10 µlを加え、30℃で2時間反応させた。遠心上清を除去後、水洗し、0.1% TFA(Trifluoroacetic acid)を含む50%アセトニトリル300 µlを加え反応停止させ、超音波処理によりフラボノイドを樹脂より遊離した。15,000 rpm、5分、4℃で遠心分離し、得られた上清をフィルター(ポアサイズ0.45 µm、4 mm Millex-LH、ミリポア)を用いて不溶物を除去して、液体高速クロマトグラフィーで分析した。カルコンおよびその配糖体の分析条件は以下の通りである。

カラムはYMC-ODS-A312(6 mm φ×150 mm、株式会社ワイエムシー)を用いて、移動相にはA液として2%酢酸を含むH₂O、B液としてメタノールを用い、B液15%からB液40%の直線濃度勾配15分間の溶出後、B液40%で5分間維持し、さらにB液40%からB液62%の直線濃度勾配10分間の溶出の後、B液62%で2分間維持した。流速は1.0 ml/minで行った。検出は360 nmにおける吸光度、及びPDA検出器SPD-M6A(島津製作所社)による250~400 nmの吸収スペクトルにより行った。この条件で、THCは保持時間27.3分に溶出され、その2'位配糖体は19.8

9分に溶出されることをTHC及びTHC 2'位配糖体の標準品を用いて確認した。

5 T 1 7 0由来の糖転移酵素遺伝子を発現させた大腸菌の抽出液を反応させたところ、THC（保持時間27.3分）に加え、19.89分に溶出される新たな物質が検出された。これらはpQE-61ベクターのみを発現させた大腸菌から同様に調製した粗抽出液を反応させたものでは検出されなかったことから、T 1 7 0に由来する糖転移酵素によって生じた産物と考えられる。

10 以上の結果から、T 1 7 0由来の糖転移酵素はTHCの2'位の水酸基にグルコースを糖転移する活性を有することが確認された。

実施例6 T 1 7 0の植物での発現ベクターの構築

15 T 1 7 0由来のカルコン2'位糖転移酵素遺伝子産物の植物体での機能を明らかにするために、THCの2'位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードするcDNA T 1 7 0を発現させ、本酵素とTHCを基質とするペチュニア由来のカルコンイソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするCHI遺伝子の1つであるCHI-A遺伝子（EM B0 J 7,1257(1988)）の発現を抑制するバイナリーベクター（pSPB1342）を構築した。pSPB1342の作製は以下のように行った。

20 ペチュニア（品種バカラレッド、サカタのタネ社）の葉よりRNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN社）を用いてtotal RNAを抽出し、これよりSuper Script™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR（Invitrogen社）を用いてcDNAを合成した。このcDNAよりプライマー、BamHI-CHI-F（配列番号49）およびSal-CHI-R（配列番号50）、Sal-CHI-F（配列番号51）およびEcoRI-CHI-R（配列番号52）を用いてPCRによりそれぞれ0.6kbおよび0.8kbのペチュニアCHI遺伝子断

- 片を得た。得られた断片をそれぞれ *Bam*HI および *Eco*RI、*Sal*I および *Eco*RI で消化したペチュニアCHI遺伝子断片を作製した。一方 pE2113 (Mitsuhara et al. Plant Cell Physiol. 37, 45-59 1996) はエンハンサー配列を繰り返したカリフラワーモザイクウィルス35S (*E1235S*) プロモーター
- 5 とノパリンシンターゼ (*nos*) ターミネーターを有する。pE2113を *Sna*BI で消化し、*Bam*HI リンカー (タカラ) を挿入することにより、pUE6を得た。pUE6を *Sac*I で消化し、平滑末端化し、*Sal*I リンカー (たとえばタカラ社) を挿入した。このプラスミドを *Hind*III と *Eco*RI で消化して得られるDNA断片のうち *E1235S* プロモーターを有する断片を植物形質転
- 10 換用バイナリーベクター pBINPLUS (vanEngelen et al. Plant Mol. Biol. 15, p373 (1995)) の *Hind*III-*Eco*RI サイトに挿入した。このプラスミド pSPB176 を *Bam*HI と *Sal*I で消化したDNA断片と前述の2種のペチュニアCHI遺伝子断片を連結することにより pSPB1601を得た。この pSPB1601 を *Asc*I で消化後、脱リン酸化した。
- 15 次に、pBluescriptII (*sk-*) (ストラタジーン社) のマルチクローニングサイト *Eco*RI-XhoI サイトに挿入されている T170 遺伝子を *Bam*HI (*cDNA* の 5' 端側) と *Kpn*I (*cDNA* の 3' 端側) で消化し、約 1.5 kb の T170 *cDNA* 断片を得た。pUCAP (van Engelen et al. Transgenic Research 4, 288-290, 1995) の *Pac*I 部位を *Asc*I リンカーで置
- 20 換したプラスミドを pUCAA 上で、当該 pUCAA の *Hind*III 切断部位を 5' 末端、*Eco*RI 切断部位を 3' 末端として、MAC1 プロモーター (Plant Mol. Biol. 15, p373(1990))、T170 遺伝子及びマンノピン合成酵素遺伝子 (*mas*) ターミネーターからなる T170 遺伝子の発現カセットを構築した (pSPB1500)。
- 25 *Bam*HI-CHI-F) 5' -tttggatccttttatattcatgtaatcttagaac -3' (配列番号 49)
Sal-CHI-R) 5' -tttgtcgacgtttacaacatcaggcccatttg-3' (配列番号 50)
Sal-CHI-F) 5' -tttgtctacttttatattcatgtaatcttagaac -3' (配列番号 51)

EcoRI-CHI-R) 5' -tttgaattctattgattccagcactgcttcag -3' (配列番号 5 2)

上記のようにして構築された T 1 7 0 発現カセット全体を A s c I 切断によって回収し、前述の p S P B 1 6 0 1 の A s c I 切断部位にペチュニアの C H I 発現抑制カセットと同じ方向、すなわち両発現カセット
5 ともにバイナリーベクターのレフトボーダー (L B) 側が上流になるように挿入し、得られたプラスミドを p S P B 1 3 4 2 とした。

次に、p S B P 1 3 4 2 を持つアグロバクテリウムを作製し、リーフディスクを用いるアグロバクテリウム法でペチュニア (品種 P L) リーフディスクに形質転換を行った。形質転換の方法は公知の方法 (Plant
10 J. 1994 5 p81) によった。

実施例 7 T 1 7 0 の植物での発現とフラボノイド組成の変化

実施例 6 で作製した p S P B 1 3 4 2 をアグロバクテリウムツメファシエンス A g 1 0 株 (Lazo et al., Bio /Technology 9, 963-967, 199
15 1) に導入し、リーフディスクを用いるアグロバクテリウム法でペチュニア (品種 P L) リーフディスクに形質転換を行った。アグロバクテリウムへのプラスミドの導入、形質転換の方法は公知の方法 (Plant J. 1994 5 p81) によった。品種 P L はフラボノイド 3' , 5' -水酸化酵素遺伝子 (Holton et al. (1993) Nature 366, p276-279)、フラボノイド
20 3' -水酸化酵素遺伝子 (Brugliera et al. (1999) Plant J 19, p441-451) を欠損しているため花色は白ないし薄いピンクである。なお、本実験の目的には使用するペチュニア品種は P L に限定されるものではない。

上記のようにして 6 1 系統の独立した形質転換ペチュニアを得た。ペチュニア花卉から R N e a s y P l a n t M i n i K i t (Q I
25 A G E N) を用いて t o t a l R N A を得た。この t o t a l R N A 1 μ g から S U P E R S C R I P T F i r s t - S t r a n d S y n t h e s i s S y s t e m f o r R T - P C R (I N V I

TROGEN) を用いて逆転写反応を行い、さらに Ex Taq (Takara) を用いて製造者の推奨する方法により RT-PCR 反応を実施した。T170 の mRNA の増幅にはプライマー T170F と T170R を、ペチュニア CHI mRNA の増幅にはプライマー CHIF1
5 と CHIR1 を用いた。各プライマーの配列は以下のとおりである。

T170F : 5'-GAGCAAAGCACCGTTCGAGTTG-3' (配列番号 22)

T170R : 5'-CTCCGTACATGATTGCAGAGAGCA-3' (配列番号 23)

CHIF1 : 5'-GCAAAAATGTCTCCTCCAGTGTCC-3' (配列番号 24)

CHIR1 : 5'-ACTTCTCAATGGCACGACCCTC-3' (配列番号 25)

10 その結果、38 系統のペチュニア花卉で T170 の mRNA が検出され、32 系統のペチュニアでペチュニア CHI mRNA の減少が観察された。

T170 の mRNA が検出されたペチュニア花卉 0.5 g を 2.5 ml の 0.1% トリフルオロ酢酸を含む 50% アセトニトリルに浸潤し、
15 フラボノイドを抽出後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分析した。HPLC の条件は、ODS-A-312 (150×6.0 mm) を用いた実施例 5 と同じ条件を用いた。本条件ではカルコン 2' 位配糖体、カルコン 4' 位配糖体はそれぞれリテンションタイム 19.89 分、21.69 分に溶出される。T170 を発現しているペチュニアのうち 3 系統でカルコン 2' 位配糖体に対応するピークをもち、また
20 同じ吸収スペクトルを有していた。さらに T170 を発現しているペチュニア花卉の抽出物とカルコン 2' 位配糖体をコクロマトグラフィーにより解析したところ、両者のピークは完全に一致した。以上の結果より、T170 の発現によりカルコン 2' 位配糖体が合成された、すなわち T
25 170 は植物の中で機能するカルコン 2' 位糖転移酵素をコードしていることを示すことができた。なお、形質転換ペチュニアにおいては、ペチュニア CHI の mRNA 量は減少していたものの低レベルの転写が認

められた。

実施例 8 T 1 7 0 の植物での発現ベクターの構築 2

T 1 7 0 の発現とペチュニア C H I 遺伝子の抑制だけでは十分量のカルコン 2' 位配糖体の蓄積が十分ではなかったため、ペチュニアのフラバノン 3 水酸化酵素遺伝子 (F 3 H) (British et al. (1993) European J. Biochemistry 217, p745-754) あるいはジヒドロフラボノール 4 還元酵素遺伝子 (D F R) (Beld et al. (1989) Plant Molecular Biology 13, p491-502, Huits et al. (1994) Plant J. 6, p295-310) の抑制を行うことにした。

(8-1) ペチュニア F 3 H c DNA 二本鎖コンストラクト構築

ペチュニア F 3 H の c DNA 遺伝子を p B l u e s c r i p t I I (s k -) にクローニングした p S P B 2 6 5 を鋳型に用い、M 1 3 R V p r i m e r (配列番号 4 8) と P h F 3 H - 1 - C l a I p r i m e r (配列番号 4 0) の組み合わせで PCR を行い、P h F 3 H - 1 断片を得た。この P h F 3 H 断片を Z e r o B l u n t T O P O P C R C l o n i n g K i t (I n v i t r o g e n) を用いてクローニングした後、S a c I と C l a I で切り出し、約 0. 7 k b の断片 P h F 3 H - 1' とした。一方、p S P B 2 6 5 を B a m H I と C l a I で消化して約 0. 9 k b の断片を切り出し P h F 3 H - 2' とした。p U E 6 を p U C A P (van Engelen et al. Transgenic Research 4, 288-290, 1995) の A s c I 部位を平滑末端化し、P a c I リンカーを挿入したプラスミドを p U C P P とした。p U E 6 を E c o R I と H i n d I I I で消化して得られる断片のうち E 1 2 3 5 S プロモーターを含む DNA 断片を、p U C P P の H i n d I I I - E c o R I 部位に挿入した。このプラスミドを p S P B 5 4 0 とした。p S P B 5 4 0 を B a m H I と S a c I で消化して得られる約 3. 7 k b の DNA 断片と、P h F 3 H - 1' と P h F 3 H - 2' 断片をライゲーションによって p S P B 1 4 9 8 を構築した。結果、この p S P B 1 4 9 8 は E L 2 3 5 S プロモーターと N O S ターミネ

ーター制御下に *dsF3H* を転写できる構造をとる。

次に、*pSPB1498 (dsPhF3H)* を *PacI* により消化した結果得られた約 2.6 kb の遺伝子カセットを *T170* と *dsCHI* をもつバイナリーベクター *pSPB1342* の *PacI* 部位に導入し *T170・dsCHI・dsF3H* の 3 種の遺伝子が同方向に並んだバイナリーベクター *pSPB2201* を構築した。

M13RV) 5'-caggaaacagctatgac-3' (配列番号 48)

PhF3H-*ClaI*) 5'-tggttcctggatcagtggtgtcttttc-3' (配列番号 40)

(8-2) ペチュニアDFRcDNA 二本鎖コンストラクト構築

10 ペチュニアDFR遺伝子を含む *pCGP1403* (WO96136716) を *BamHI* および *ScaI*、*PvuII* および *SacI* により消化し、それぞれ 0.85 kb および 0.45 kb の断片を得た。2 本鎖 RNA 構造を形成するこれら両断片と *EL2 35S* プロモーター (Mitsuhara et al. Plant Cell Physiol. 37, p49) ならびに *mas* ターミネーターから構成されるカセットを、植物形質転換用

15 バイナリーベクター *pBINPLUS* (vanEngelen et al. Plant Mol. Biol. 15, p373) の MCS 内 *HindIII* - *EcoRI* 間に挿入し、これを *pSPB532* とした。これを *PacI* で消化後、脱リン酸化した。

次に実施例 6 に記述した、*EL2 35S* プロモーターと 2 本鎖 RNA 構造をもつペチュニア *CHI* 遺伝子ならびに *NOS* ターミネーターから構成されるカセット

20 トを含む *pSPB1601* を *HindIII* および *EcoRI* で消化し、約 2.5 kb の断片を得た。これをベクター *pUCPP* の *HindIII* - *EcoRI* 間に挿入し、*pSFL5* とした。これを *PacI* で切断し、*pUCPP* ベクターから切り出し得られた約 2.5 kb の断片を前述の *pSPB532* の *PacI* 切断部位

25 にベクターの LB 側が上流になるように挿入し、得られたプラスミドを *pSFL13* とした。次にこれを *AscI* で消化後、脱リン酸化した。実施例 6 に記述したプラスミドベクター *pUCAA* 上で、*MAC1* プロモーター (Comai et al. (1990)

Plant Mol. Biol. 15, p373) 、 T 1 7 0 遺伝子及びマンノピン合成酵素遺伝子ターミネーターからなる T 1 7 0 遺伝子の発現カセットを、A s c I で切断し、p U C A A ベクターから切り出し、約 3 . 5 k b の断片を得た。これを前述の p S F L 1 3 の A s c I 切断部位にペチュニアの D F R および C H I 発現抑制カセットと
5 同じ方向になるように挿入し、得られたプラスミドを p S F L 1 4 とした。

実施例 9 カルコン糖転移酵素遺伝子 T 1 2 8 の取得

カーネーションには T 1 7 0 以外にもカルコン糖転移酵素遺伝子が存在する可能性があるため探索を継続した。実施例 2 で得た糖転移酵素のうち p T 1 2 8 としたプラスミドに含まれる c D N A の塩基配列とアミノ酸配列を配列表の配列番号 1 4 、 1 5 に示した。p T 1 2 8 に含まれる c D N A は、4 8 9 アミノ酸からなる分子量 5 5 . 2 k D a のタンパク質をコードする 1 4 6 7 b p の遺伝子 T 1 2 8 を含んでいた。T 1 2 8 がコードするアミノ酸配列を、すでに報告のある糖転移酵素と実施例 3 に記載したように比較したところリビングストーンデージー由来 G T と 5 4 % 、バーベナ由来 5 G T と 2 4 % の同一性を示した。また T 1 7 0 とは 2 7 % の同一性を示した。
10
15

実施例 1 0 大腸菌における T 1 2 8 遺伝子の発現と活性測定

T 1 2 8 遺伝子の大腸菌での発現は、実施例 4 に記載された方法と同じ The Q I A e x p r e s s i o n i s t (Q I A G E N) を用いて行った。まず T 1 2 8 上の糖転移酵素遺伝子の開始コドンの 5 ' 側に N c o I 認識配列を導入するために、以下に示すプライマー T 1 2 8 - N c o I と実施例 4 で示した M 1 3 M 4 を用いて実施例 4 と同様の P C R 反応を行った。
20
25

T128-NcoI : 5' -ACAATTTTCAGCCATGGGCAC -3' (配列番号 2 6)

得られた P C R 産物を p C R 2 . 1 T O P O v e c t o r (I

N V I T R O G E N) に製造者が推奨する方法でサブクローニングした。
このようにして得られたプラスミドを p T O P O - T 1 2 8 とした。P
C R 反応によるエラーがないことを塩基配列を決定することにより確認
した。p T O P O - T 1 2 8 を N c o I、K p n I で制限酵素処理し得
5 られた約 1.8 k b のフラグメントを p Q E - 6 1 v e c t o r (Q I A G E N) の同サイトに連結し、プラスミド p S P B 1 4 4 1 を得た。p S B 1 4 4 1 を C o m p e t e n t h i g h J M 1 0 9 (T O Y O B O) に形質転換した。

この大腸菌形質転換株を、実施例 5 に記載されている方法で培養し、
10 粗酵素液を得た。これを用いて実施例 5 に記載されている方法でカルコンを基質とした糖転移活性を測定した。T 1 2 8 由来の糖転移酵素遺伝子を発現させた大腸菌の抽出液を反応させたところ、T H C (保持時間 27.3 分) に加え、19.89 分と 21.69 分に溶出される新たな物質が検出された。前者は T H C の 2' 位配糖体で、後者は T H C の 4'
15 ' 位配糖体であることを、それぞれの標準品の保持時間と比較することで同定した。これらは p Q E - 6 1 ベクターのみを発現させた大腸菌から同様に調製した粗抽出液を反応させたものでは検出されなかったことから T 1 2 8 に由来する糖転移酵素によって生じた産物と考えられる。以上の結果から、T 1 2 8 由来の糖転移酵素は T H C の 2' 位と 4' 位
20 の水酸基にグルコースを糖転移する活性を有することが確認された。

実施例 11 T 1 2 8 の植物での発現ベクターの構築

T 1 2 8 由来のカルコン糖転移酵素遺伝子産物の植物体での機能を明らかにするために、T 1 2 8 を発現させ、本酵素と基質を同じにするべ
25 チュニア由来のカルコンイソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードする C H I - A 遺伝子の発現を抑制させる共発現バイナリーベクター (p S P B 2 1 0 8) を構築した。p S P B 2 1 0 8 の作製は実施例 6 と

同様に以下のように行った。

まず、pSPB1601をAscIで消化後、脱リン酸化した。

次に、pBluescriptII (sk-) のマルチクローニング
サイトに挿入されているT128遺伝子を、BamHI (cDNAの5
5' 端側) とKpnI (cDNAの3' 端側) で消化し、T128cDNA
断片を得た。次にプラスミドベクターpUCAA上で、MAC1プロ
モーター、T128遺伝子及びマンノピン合成酵素遺伝子ターミネー
ターからなるT170遺伝子の発現カセットを、pUCAAベクターのB
amHI切断部位を5' 端、KpnIサイトを3' 端として構築した。
10 このT128発現カセット全体をAscI切断によってpUCAAベク
ターから切り出した。

pUCAAベクターからAscIで切り出した発現カセットを、前述
のpSPB1601のAscI切断部位に、ペチュニアのCHI発現抑
制カセットと同じ方向、すなわち両発現カセットともにベクターのLB
15 側が上流になるように挿入し、得られたプラスミドをpSPB2108
とした。

実施例12 カルコン糖転移酵素遺伝子CGT93の取得

T170をプローブとして、カーネーション花卉ライブラリー240
20 00プラークよりスクリーニングを行った。スクリーニングによりプラ
スミドpCGT93を得た。pCGT93に含まれるcDNAは、48
1アミノ酸からなる分子量52.8kDaのタンパク質をコードする1
443bpの遺伝子CGT93を含んでいた。CGT93がコードする
アミノ酸配列を、すでに報告のある糖転移酵素と実施例3に記載したよ
うに比較したところリビングストーンデージー由来GTと26%、バー
25 ベナ由来5GTと23%の同一性を示した。またT170とは63%、
T128とは25%の同一性を示した。pCGT93中に含まれる遺伝

子を含む塩基配列および当該塩基配列にコードされているアミノ酸配列を配列番号 16、17 にそれぞれ示す。

実施例 13 大腸菌における CGT93 遺伝子の発現と活性測定

5 CGT93 遺伝子の大腸菌での発現は、実施例 4 に記載された方法と同じ The QIA expressionist (QIAGEN) を用いて行った。まず CGT93 上の糖転移酵素遺伝子の開始コドンの 5' 側に NcoI 認識配列を導入するために、以下に示すプライマー A93-75BspHI と A93-75-BglII を用いて実施例 4 と
10 同様の PCR 反応を行った。

A93-75BspHI : 5'-ACAGGATCATGACTTCAGGG-3' (配列番号 27)

A93-75-BglII : 5'-GGAAGATCTAATATACGTGAGTAC-3' (配列番号 28)

得られた PCR 産物を pCR-BluntII-TOPO vector (INVITROGEN) に製造者が推奨する方法でサブクロー
15 ニングし、pSPB1469 とした。PCR 反応によるエラーがないことを塩基配列を決定することにより確認した。この pSPB1469 を BspHI、BglII で制限酵素処理し得られた約 1.8 Kb のフラグメントを pQE-61 vector の NcoI、BglII 切断部位に連結し、プラスミド pSPB1470 を得た。この pSPB14
20 70 を Competent high JM109 に形質転換した。

この大腸菌形質転換株を、実施例 5 に記載されている方法で培養し、粗酵素液を得た。これを用いて実施例 5 に記載されている方法でカルコンを基質とした糖転移活性を測定した。

CGT93 由来の糖転移酵素遺伝子を発現させた大腸菌の抽出液を
25 反応させたところ、THC (保持時間 27.3 分) に加え、19.89 分に溶出される新たな物質が検出された。これは THC の 2' 位配糖体の保持時間と一致し、pQE-61 ベクターのみを発現させた大腸菌か

ら同様に調製した粗抽出液を反応させたものでは検出されなかったことからCGT93に由来する糖転移酵素によって生じた産物と考えられる。以上の結果から、CGT93由来の糖転移酵素はTHCの2'位の水酸基にグルコースを糖転移する活性を有することが確認された。

5

実施例14 CGT93を含む植物発現ベクターの構築

CGT93由来のカルコン糖転移酵素遺伝子産物の植物体での機能を明らかにするために、CGT93を発現させ、本酵素と基質を同じにするペチュニア由来のカルコンイソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするCHI-A遺伝子の発現を抑制させる共発現バイナリーベクター（pSPB1494）を構築した。pSPB1494の作製は実施例6と同様に以下のように行った。

まず、pSPB1601をAscIで消化後、脱リン酸化した。

次に、pBluescriptII（sk-）のマルチクローニング
15 サイトに挿入されているCGT93遺伝子をXhoI（cDNAの3'端側）で消化後、DNA Blunting Kit（Takara）にて平滑化し、次にBamHI（cDNAの5'端側）で消化してCGT93 cDNA断片を得た。得られたCGT93 cDNA断片を、
プラスミドベクターpUCAA上で、MAC1プロモーター、マンノピ
20 ン合成酵素遺伝子ターミネーターからなるpSPB184をKpnIで消化後DNA Blunting Kitにて平滑化して更にBamHIにて消化したサイトへ挿入した。ベクターのBamHI切断部位を5'端、KpnIサイトを3'端としてMAC1プロモーター、CGT93遺伝子及びマンノピン合成酵素遺伝子ターミネーターからなる遺伝
25 子の発現カセットpSPB1493を構築した。

このように構築したpSPB1493をAscI切断によってCGT93発現カセット全体をpUCAAベクターから切り出し、前述のp

S P B 1 6 0 1 の A s c I 切断部位にペチュニアの C H I 発現抑制カセットと同じ方向、すなわち両発現カセットともにベクターの L B 側が上流になるように挿入し、得られたプラスミドを p S P B 1 4 9 4 とした。

5 実施例 1 5 サブトラクションライブラリーの作製

実施例 1 に述べた方法で黄色カーネーションのつぼみの花卉と葉から p o l y A + R N A を得た。C L O N T E C H P C R - S e l e c t c D N A S u b s t r a c t i o n K i t (C L O N T E C H) を用い製造者の推奨する方法により花卉で発現する遺伝子を濃縮した
10 c D N A ライブラリーを作製した。ランダムシーケンスの結果、G T と相同性のあるクローンを 1 6 種類得た。サブトラクションで得られたこれら G T ホモログクローンは完全長として得られなかったので、再度 G T ホモログ断片をプローブとして花卉 c D N A ライブラリーより 2 4 , 0 0 0 クローンについてスクリーニングを行った。スクリーニングは実
15 施例 2 に記載の方法に従った。

実施例 1 6 カルコン糖転移酵素遺伝子 S 6 B 1 1 の取得

実施例 1 5 のサブトラクションによって得られたクローン p S 6 B 1 1 としたプラスミドに含まれる c D N A の塩基配列とアミノ酸配列を配
20 列表の配列番号 1 8 、 1 9 に示した。p S 6 B 1 1 に含まれる c D N A は、4 8 3 アミノ酸からなる分子量 5 4 . 4 k D a のタンパク質をコードする 1 4 4 9 b p の遺伝子 S 6 B 1 1 を含んでいた。すでに報告のある糖転移酵素と実施例 3 に記載したように比較したところリビングストーンデージー由来 G T と 6 0 % 、バーベナ由来 5 G T と 2 6 % の同一性を示した。また T 1 7 0 、 T 1 2 8 、 C G T 9 3 とはそれぞれ 2 7 % 、
25 5 4 % 、 2 7 % の同一性を示した。

実施例 17 S 6 B 1 1 の植物での発現ベクターの構築

S 6 B 1 1 由来のカルコン糖転移酵素遺伝子産物の植物体での機能を明らかにするために、S 6 B 1 1 を発現させ、本酵素と基質を同じにするペチュニア由来のカルコンイソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードする C H I - A 遺伝子の発現を抑制させる共発現バイナリーベクター (p S P B 1 3 3 5) を構築した。p S P B 1 3 3 5 の作製は実施例 6 と同様に以下のように行った。

まず、p S P B 1 6 0 1 を A s c I で消化後、脱リン酸化した。

次に、p B l u e s c r i p t I I (s k -) のマルチクローニング
10 サイトに挿入されている S 6 B 1 1 遺伝子を B a m H I (c D N A の 5' 端側) と K p n I (c D N A の 3' 端側) で消化し、S 6 B 1 1 c D N A 断片を得た。次にプラスミドベクター p U C A A 上で、M A C 1 プロモーター、S 6 B 1 1 遺伝子及びマンノピン合成酵素遺伝子ターミネーターからなる S 6 B 1 1 遺伝子の発現カセットを、ベクターの B a m
15 H I 切断部位を 5' 端、K p n I 切断部位を 3' 端として作製した。この S 6 B 1 1 発現カセット全体を A s c I 切断によって p U C A A ベクターから切り出した。

上記のように切り出した S 6 B 1 1 発現カセットを、前述の p S P B 1 6 0 1 の A s c I 切断部位にペチュニアの C H I 発現抑制カセットと同じ方向、すなわち両発現カセットともにベクターの L B 側が上流になるように挿入し、得られたプラスミドを p S P B 1 3 3 5 とした。

実施例 18 S 6 B 1 1 の植物での発現とフラボノイド組成の変化

実施例 7 に記述したように、p S P B 1 3 3 5 をアグロバクテリウム
25 ツュメファシエンス A g 1 0 株に導入し、ペチュニア P L 株を形質転換した。

上記のようにして 27 系統の独立した形質転換ペチュニア P L 株を得

た。ペチュニア花卉のRNAを用いて実施例7と同様のRT-PCR反応を実施した。S6B11のmRNAの増幅にはプライマーS6B11-RT-FとS6B11-RT-Rを、CHI mRNAの増幅には実施例7と同じCHIF1とCHIR1を用いた。各プライマーの配列は
5 以下のとおりである。

S6B11-RT-F:5'-GTAATCCGCTCATCAATGTGGAG-3' (配列番号29)

S6B11-RT-R:5'-AGCAAATGGTTCGTCGTCAGAC-3' (配列番号30)

その結果、24系統のペチュニア花卉でS6B11のmRNAが検出され、11系統のペチュニアでCHI mRNAの減少が観察された。S
10 6B11のmRNAが検出されたペチュニア花卉から実施例7と同様にフラボノイドを抽出し、ODS-A-312を用いたメタノール溶媒系の高速液体クロマトグラフィーにて分析を行った。S6B11を発現しているペチュニアのうち4系統でカルコン2'位配糖体に対応するピークをもち、また同じ吸収スペクトルを有していた。さらにS6B11を
15 発現しているペチュニア花卉の抽出物とカルコン2'位配糖体をコクロマトグラフィーにより解析したところ、両者のピークは完全に一致した。以上は、S6B11の発現によりカルコン2'位配糖体が合成された、すなわちS6B11は植物の中で機能するカルコン2'位糖転移酵素をコードしていることを示すことができた。なお、形質転換ペチュニアに
20 おいては、CHIのmRNA量は減少していたものの低レベルの転写が認められた。

実施例19 カルコン糖転移酵素S12A2の取得

実施例15のサブトラクションによって得られたクローンpS12A
25 2-aは5'領域が欠失していた。S12A2-RT, S12A2-S1, S12A2-A1, S12A2-S2, S12A2-A2の4種のプライマーと5'-Full RACE Core Set (

Takara) を用いた 5' -RACE により約 0.4 kb 程度の断片を TA cloning した (pS12A2-b)。プライマーについては以下に示す。

S12A2-NcoI : 5'-ACCAGACCATGGGTGCTG-3' (配列番号 31)

5 S12A2-S1 : 5'-GAGATTGCAATGCGCATCC-3' (配列番号 32)

S12A2-S2 : 5'-GTGGCCGACATGTTTACCC-3' (配列番号 33)

S12A2-A1 : 5'-GCATTCTCACAACCCTCAGG-3' (配列番号 34)

S12A2-A2 : 5'-TCTGTTACCCGTGTCAACTGC-3' (配列番号 35)

pS12A2-b を鋳型に更に S12A2-NcoI と S12A2-A2 で PCR して増幅した断片を再び TA クローニングした (pS12A2-c)。pS12A2 を NdeI, KpnI 消化した挿入断片側を、pS12A2-c の同サイトに導入したベクターを構築し、全長を含むクローンが得られた (pS12A2-d)。プラスミドに含まれる cDNA の塩基配列とアミノ酸配列を配列表の配列番号 20、21 に示した。pS12A2-d に含まれる cDNA は、486 アミノ酸からなる分子量 55.0 kDa のタンパク質をコードする 1458 bp の遺伝子 S12A2 を含んでいた。すでに報告のある糖転移酵素と実施例 3 に記載したように比較したところリビングストーンデージー由来 GT と 57%、バーベナ由来 5 GT と 25% の同一性を示した。また T170、

20 T128、CGT93、S6B11 とそれぞれ 27%、52%、27%、67% の同一性を示した。

実施例 20 大腸菌における S12A2 遺伝子の発現と活性測定

S12A2 遺伝子の大腸菌での発現は、実施例 4 に記載された方法で

25 The QIA expressionist (QIAGEN) を用いて行った。実施例 19 における pS12A2-d を NcoI と KpnI で消化し、pQE-61 の同サイトに連結し pSPB1439 を構築し

た。pSPB1439をCompetent high JM109 (TOYOBO) に形質転換した。

この大腸菌形質転換株を、実施例5に記載されている方法で培養し、粗酵素液を得た。これを用いて実施例5に記載されている方法でカルコンを基質とした糖転移活性を測定した。

S12A2由来の糖転移酵素遺伝子を発現させた大腸菌の抽出液を反応させたところ、THC (保持時間27.3分) に加え、19.89分に溶出される新たな物質が検出された。これらはpQE-6.1ベクターのみを発現させた大腸菌から同様に調製した粗抽出液を反応させたものでは検出されなかったことからS12A2に由来する糖転移酵素によって生じた産物と考えられる。以上の結果から、S12A2由来の糖転移酵素はTHCの2'位の水酸基にグルコースを糖転移する活性を有することが確認された。

15 実施例21 S12A2の植物での発現ベクターの構築

S12A2由来のカルコン糖転移酵素遺伝子産物の植物体での機能を明らかにするために、S12A2を発現させ、本酵素と基質を同じにするペチュニア由来のカルコンイソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするCHI-A遺伝子の発現を抑制させる共発現バイナリーベクター (pSPB1478) を構築した。pSPB1478の作製は実施例6と同様に以下のように行った。

まず、pSPB1601をAscIで消化後、脱リン酸化した。

次に、pBluescriptII (sk-) のマルチクローニングサイトに挿入されているS12A2遺伝子をBamHI (cDNAの5'端側) とKpnI (cDNAの3'端側) で消化し、S12A2 cDNA断片を得た。次にプラスミドベクターpUCAA上で、MAC1プロモーター、S12A2遺伝子及びマンノピン合成酵素遺伝子ターミネ

ーターからなる S 1 2 A 2 遺伝子の発現カセットを、ベクターの B a m H I 切断部位を 5' 端、K p n I 切断部位を 3' 端として構築した。この S 1 2 A 2 発現カセット全体を A s c I 切断によって p U C A A ベクターから切り出した。

- 5 上記のようにして切り出した S 1 2 A 2 発現カセットを、前述の p S P B 1 6 0 1 の A s c I 切断部位にペチュニアの C H I 発現抑制カセットと同じ方向、すなわち両発現カセットとともにベクターの L B 側が上流になるように挿入し、得られたプラスミドを p S P B 1 4 7 8 とした。

10 実施例 2 2 T 1 7 0 の植物での発現 2

p S F L 1 4 を実施例 7 に記述したように、アグロバクテリウムツメファシエンス A g 1 0 株に導入し、ペチュニア P L 株とバカラレッド株に形質転換した。同様に p S P B 2 2 0 1 も P L 株とバカラレッド株に形質転換した。

15 実施例 2 3 T 1 7 0 の植物での発現ベクターの構築 3

- ペチュニア以外の植物、トレニア・バーベナで T 1 7 0 を発現させてカルコン配糖体を蓄積させるため、トレニアについては、トレニア由来のフラバノン 3 水酸化酵素 (F 3 H) を抑制させる共発現ベクターを構築した。バーベナについてはバーベナ (タピアン (登録商標)) 由来の C H I を抑える共発現ベクターと、C H I
20 と F 3 H (花手毬 (登録商標)) の両遺伝子発現を抑える共発現ベクターを構築した。

(23-1) トレニア F 3 H c D N A 二本鎖コンストラクト (d s F 3 H) 構築

- トレニアの花弁 c D N A ライブラリー (Molecular Breeding, 6, p239, 2000) をペチュニアの F 3 H 遺伝子をプローブにして実施例 2 に記載の方法でスクリーニングしトレニアの F 3 H 遺伝子を取得した。

トレニア F 3 H の c D N A 遺伝子を p B l u e s c r i p t I I (SK-) にクローニングした p S P B 2 6 6 を鋳型に用い、M 1 3 R V P r i m e r (配列

番号48)とThF3H-SalI1 primer (配列番号41)の組み合わせでPCRを行い、ThF3H-1断片を得た。また同様に、Reverse primerとThF3H-SalI2 primer (配列番号42)の組み合わせでPCRを行い、ThF3H-2断片を得た。ThF3H-1断片・ThF3H-2断片をTOPO TA cloning kit (Invitrogen)を用いてTAクローニングした後、前者はSacIとSalIで切り出し、約0.75 kbの断片ThF3H-1'とした。一方、後者はBamHIとSalIで切り出し、約0.9 kbの断片ThF3H-2'とした。pUE6をHindIIIとEcoRIで消化して得られるプロモーターを含むDNAをpUCAAのHindIIIとEcoRI部位に挿入した。これをBamHIとSacIで消化して得られる約3.8 kbのDNA断片とThF3H-1'とThF3H-2'断片をライゲーションによってpSFL308を構築した。結果、このpSFL308はEL235Sプロモーター下にdsF3HとNOSターミネーターをもつ構造をとる。pSFL308(dsThF3H)をAscIにより消化した結果得られた約2.7 kbの断片を平滑化した後、pBINPLUSのSmaI部位に導入してpSPB2218を作製した。Macプロモーターとmasターミネーターに挟まれたT170遺伝子カセット約3.7 kbをpSPB1342からAscIで切り出し、pSPB2218のAscI部位に導入し、T170とdsF3Hの2つの遺伝子が同方向に載ったバイナリーベクターを構築した(pSPB2223)。

20 ThF3H-SalI1) 5' -ttctctgtcgacgccattgcc-3' (配列番号41)

ThF3H-SalI2) 5' -cgccgtgtcgactcgcttgaag-3' (配列番号42)

(23-2) バーベナ(花手毬(登録商標)) dsF3Hの構築

バーベナの花弁cDNAライブラリー(Plant Cell Physiol. 44 s122 (2003))をペチュニアのF3H遺伝子をプローブにして実施例2に記載の方法でスクリーニングしバーベナのF3H遺伝子を取得した。

バーベナF3HのcDNA遺伝子をpBluescriptII(skr-)にクローニングしたpSPB9をBstXIで消化後平滑化し、その後、BamHで部

分消化し、約1.1 kbの遺伝子断片を回収してH a F 3 H-1とした。また、p S P B 9をS a c IとH a e I Iで消化し、約0.7 kbの遺伝子断片を回収してH a F 3 H-2とした。p S P B 5 4 0をB a m H IとS a c Iで消化して得られる約3.8 kbのDNA断片とH a F 3 H-1とH a F 3 H-2断片をライゲーションによってp S P B 2 5 0 1を構築した。このp S P B 2 5 0 1はE L 2 3 5 Sプロモーター下にd s F 3 HとNOSターミネーターをもつ構造をとる。

(23-3) バーベナ (タピアン (登録商標)) d s C H Iの構築

バーベナの花弁cDNAライブラリー (Plant Cell Physiol. 44 s122 (2003))をペチュニアのF 3 H遺伝子をプローブにして実施例2に記載の方法でスクリーニングしバーベナのF 3 H遺伝子を取得した。

バーベナC H IのcDNA遺伝子をp B l u e s c r i p t I I (s k-)にクローニングしたp S P B 2 1 0 9を鋳型に用い、M13RV Primer (配列番号48)とT p C H I-X b a I 2 p r i m e r (配列番号45)の組み合わせでPCRを行い、T p C H I-1断片を得た。また同様にT p C H I-S a l I p r i m e r (配列番号43)とT p C H I-X b a I 1 p r i m e r (配列番号44)の組み合わせでPCRを行い、T p C H I-2断片を得た。T p C H I-1断片・T p C H I-2断片をZ e r o B l u n t T O P O P C R C l o n i n g K i t (I n v i t r o g e n)を用いてクローニングした後、前者はB a m H IとX b a Iで切り出し、約0.68 kbの断片T p C H I-1'とした。一方、後者はX b a IとS a l Iで切り出し、約0.5 kbの断片T p C H I-2'とした。p S P B 1 7 6のGUS遺伝子領域をB a m H IとS a l Iで切り出して除いたDNA断片と、T p C H I-1'とT p C H I-2'断片をライゲーションによってp S P B 1 4 8 6を構築した。その結果、p S P B 1 4 8 6はE L 2 3 5 Sプロモーター下にd s C H IとNOSターミネーターをもつ構造をとる。このp S P B 1 4 8 6をP a c Iで消化後、P a c I-F s e I F (配列番号46)とP a c I-F s e I R (配列番号47)の2種類のオリゴDNAをアニールさせたP a c I-F s e Iアダプターを導入し、新たにF s e I部位を導入したp S

P B 2 5 0 8 を作製した。

TpCHI-SalI) 5' -acgcagaaaaaagtcgactg-3' (配列番号 4 3)

TpCHI-XbaI1) 5' -gaggtgattgggtctagag-3' (配列番号 4 4)

TpCHI-XbaI2) 5' -atttctagagcaggtccgacaat-3' (配列番号 4 5)

5 PacI-FseIF) 5' -taactgcactgaggccggccagat-3' (配列番号 4 6)

PacI-FseIR) 5' -ctggccggcctcagtgacagttaat-3' (配列番号 4 7)

(23-4) バーベナ (花手毬 (登録商標)) d s F 3 H + バーベナ (タピアン (登録商標)) d s C H I の構築

p S P B 2 5 0 1 を P a c I で消化して得られる、2.9 kb の遺伝子断片を p
10 S P B 2 5 0 8 の P a c I 部位に導入し、p S P B 2 5 0 4 を構築した。

(23-5) バーベナでの T 1 7 0 遺伝子発現ベクターの構築 (T 1 7 0 + d s C H I)

実施例 6 の p S P B 1 5 0 0 を A s c I によって切り出し、生じる 3.7 kb の
T 1 7 0 遺伝子カセットを、p S P B 1 4 8 6 の A s c I 部位に導入することによ
15 り、T 1 7 0 と d s C H I の 2 種類の遺伝子カセットを載せたバイナリーベクター
p S P B 1 2 8 7 を構築した。

(23-6) バーベナでの T 1 7 0 遺伝子発現ベクターの構築 2 (T 1 7 0 + d s C H I + d s F 3 H

p U C 1 9 の E c o R I 部位に E c o F s e 1 (配列番号 5 7) と E c o F s e
20 R (配列番号 5 8) のオリゴDNA をアニールさせたアダプター E c o F s e 1 R
を導入後、H i n d I I I 部位に H i n F s e R (配列番号 5 9) と H i n F s e
3 (配列番号 6 0) のオリゴDNA をアニールさせたアダプター H i n F s e 3 R
を導入して、p U C 1 9 のマルチクローニングサイトの両端側に 2 ヶ所の F s e I
部位を導入したベクターを構築した (p S P B 1 8 3 8)。p S P B 1 8 3 8 を H
25 i n d I I I と E c o R I で消化した後、末端平滑化した部位に、実施例 6 の p S
P B 1 5 0 0 を A s c I によって切り出し、生じる 3.7 kb の T 1 7 0 遺伝子カ
セットを末端平滑化後、挿入することにより p S P B 2 5 0 5 を構築。この作業に

よりT170の遺伝子カセットがFseIを用いて切り出すことが可能となる。

pSPB2505をFseI消化して得られる3.7kbのT170遺伝子カセットをpSPB2504のFseI部位に導入してpSPB2507を構築した。以上の結果、pSPB2507にはdsCHIとT170、dsF3Hの3遺伝子カセットが同方向に並んだ構造をとる。

実施例24 バーベナでのT170の発現

pSPB1287をアグロバクテリウムツメファシエンスAg10株(Biotechnology)に導入し、田村らの方法(Tamura et al. (2003) Plant Cell Rep. 21, p459-466)によりバーベナ(品種 花手毬スカーレット)に形質転換を行った。

上記のようにして7系統の独立した形質転換バーベナを得た。バーベナ花卉のRNAを用いて実施例7と同様のRT-PCR反応を実施した。T170のmRNAの増幅には実施例7と同様のプライマーT170FとプライマーT170Rのプライマーを用い、バーベナCHIのmRNAの発現量はTpCHI-SalI primer(配列番号43)とTpCHI-XbaI primer(配列番号44)を用いて約0.5kbの遺伝子断片の増幅で確認した。その結果、7系統のバーベナ花卉でT170のmRNAが検出され、3系統のバーベナ花卉でバーベナCHIのmRNA発現量の減少が観察された。また、T170の発現が確認できた7系統のうち1系統(SaT170#7)の花弁花色がコントロールの赤色に比べ薄く、若干の黄色を帯びていることを確認できた。

実施例25 T128の植物での発現とフラボノイド組成の変化

実施例11で作製したpSPB2108を実施例7に記述したように、アグロバクテリウムツメファシエンスAg10株に導入し、ペチュニアPL株を形質転換した。

上記のようにして37系統の独立した形質転換ペチュニアPL株を得た。ペチュ

ニア花卉のRNAを用いて実施例7と同様のRT-PCR反応を実施した。T128のmRNAの増幅にはプライマーT128-F（配列番号38）とT128-R（配列番号39）を、CHIのmRNAの増幅には実施例8と同じCHIFとCHIRを用いた。各プライマーの配列は以下のとおりである。

- 5 T128-F) 5' -acgagttagaacccgagtatgctg-3' (配列番号38)
T128-R) 5' -cagtgtgtcacgaatcctcctacg-3' (配列番号39)

その結果、19系統のペチュニア花卉でT128のmRNAが検出され、26系統のペチュニアでCHIのmRNAの減少が観察された。T128のmRNAが検出されたペチュニア花卉中から実施例7と同様の方法でフラボノイドを抽出し、実施例5と同様の方法でHPLCにより分析を行った。T128を発現しているペチュニアのうち2系統でカルコン2'位配糖体に対応するピークをもち、また、同じ吸収スペクトルを有していた。さらにT128を発現しているペチュニア花卉の抽出物とカルコン2'位配糖体をコクロマトグラフィーにより解析したところ、両者のピークは完全に一致した。以上は、T128の発現によりカルコン2'位配糖体が合成された、すなわちT128は植物の中で機能するカルコン2'位糖転移酵素をコードしていることを示すことができた。

実施例26 T128の植物での発現ベクターの構築2

(26-1) T128+ペチュニアdsCHI+dsF3H

20 pSPB1498(dsPhF3H)をPacIにより消化した結果得られた約2.6kbの遺伝子カセットをT128とdsCHIをもつバイナリーベクターpSPB2108のPac部位に導入しT128・dsCHI・dsF3Hの3種の遺伝子を合わせもつベクターpSPB1499を構築した。

(26-2) T128+トレニアdsF3H

25 Macプロモーターとmasターミネーターに挟まれたT128遺伝子カセット約3.7kbをpSPB2108からAscIで切り出し、実施例23で作製したpSPB2218のAscI部位に導入し、T128とdsF3Hの2遺伝子が

同方向に載ったバイナリーベクターを構築した (pSPB2224)。

実施例27 T128の植物での発現2

pSPB1499を実施例7に記述したように、アグロバクテリウムツメファシ
5 エンスAg10株に導入し、ペチュニアPL株に形質転換した。

実施例28 CGT93の植物での発現ベクターの構築2

(28-1) CGT93+ペチュニアdsCHI+dsF3H

pSPB1498(dsPhF3H)をPacIにより消化した結果得られた約
10 2.6kbの遺伝子カセットをCGT93とdsCHIをもつバイナリーベクター
pSPB1494のPac部位に導入しCGT93・dsCHI・dsF3Hの3
種の遺伝子を合わせもつバイナリーベクターpSPB2202を構築した。

(28-2) CGT93+トレニアdsF3H

Macプロモーターとmasターミネーターに挟まれたCGT93遺伝子カセ
15 ャット約3.7kbをpSPB1494からAscIで切り出し、実施例23で作製
したpSPB2218のAscI部位に導入し、CGT93とdsF3Hの2遺伝
子が同方向に載ったバイナリーベクターを構築した (pSPB2225)。

実施例29 CGT93の植物での発現

20 pSPB1494を実施例7に記述したように、アグロバクテリウムツメファシ
エンスAg10株に導入し、ペチュニアPL株を形質転換した。また、pSPB2
202をペチュニアPL株とバカラレッド株に形質転換した。

実施例30 S6B11の植物での発現ベクターの構築2

25 (30-1) S6B11+ペチュニアdsCHI+dsF3H

pSPB1498(dsPhF3H)をPacIにより消化した結果得られた約
2.6kbの遺伝子カセットをS6B11とdsCHIをもつバイナリーベクター

pSPB1335のPac部位に導入しS6B11・dsCHI・dsF3Hの3種の遺伝子を合わせもつバイナリーベクターpSPB2205を構築した。

(30-2) S6B11+トレニアdsF3H

Macプロモーターとmasterミネーターに挟まれたS6B11遺伝子カセット約3.7kbをpSPB1335からAscIで切り出し、実施例23で作製したpSPB2218のAscI部位に導入し、S6B11とdsF3Hの2遺伝子が同方向に載ったバイナリーベクターを構築した(pSPB2226)。

実施例31 S6B11の植物での発現2

10 pSPB2205を実施例7に記述したように、アグロバクテリウムツメファシエンスAg10株に導入し、ペチュニアPL株に形質転換した。

実施例32 S12A2の植物での発現ベクターの構築2

(32-1) S12A2+ペチュニアdsCHI+dsF3H

15 pSPB1498(dsPhF3H)をPacIにより消化した結果得られた約2.6kbの遺伝子カセットをS12A2とdsCHIをもつバイナリーベクターpSPB1478のPac部位に導入しS12A2・dsCHI・dsF3Hの3種の遺伝子を合わせもつバイナリーベクターpSPB2206を構築した。

(32-2) S12A2+トレニアdsF3H

20 Macプロモーターとmasterミネーターに挟まれたS12A2遺伝子カセット約3.7kbをpSPB2206からAscIで切り出し、実施例23で作製したpSPB2218のAscI部位に導入し、S12A2とdsF3Hの2遺伝子が同方向に載ったバイナリーベクターを構築した(pSPB2227)。

25 実施例33 S12A2の植物での発現

実施例21で作製したpSPB1478を実施例7に記述したように、アグロバクテリウムツメファシエンスAg10株に導入し、ペチュニアPL株を形質転換し

た。また、pSPB2206もPL株に形質転換した。

実施例34 シクラメン花卉cDNAライブラリーの構築

黄色のシクラメンの新鮮な花卉5gから実施例1と同様の方法でcDNAライ
5 ブラリーを構築した。得られたライブラリーは 1.75×10^6 プラーク・フォー
ミング・ユニット (pfu) からなっていた。

実施例35 カルコン糖転移酵素遺伝子YCy3-12の取得

T170をプローブとして、シクラメン花卉ライブラリー24,000プラーク
10 よりスクリーニングを行った。スクリーニングによりプラスミドpYCy3-12
を得た。pYCy3-12に含まれるcDNAは、482アミノ酸からなる分子量
54.3kDaのタンパク質をコードする1446bpの遺伝子YCy3-12を
含んでいた。YCy3-12がコードするアミノ酸配列を、すでに報告のある糖転
移酵素と実施例3に記載したように比較したところリビングストーンデージー由
15 来GTと28%、バーベナ由来5GTと24%の同一性を示した。またT170と
は46%、T128とは28%、CGT93とは46%、S6B11とは28%、
S12A2とは27%の同一性を示した。pYCy3-12中に含まれる遺伝子を
含む塩基配列および当該塩基配列にコードされているアミノ酸配列を配列番号5
5、56にそれぞれ示す。

20

実施例36 大腸菌におけるYCy3-12遺伝子の発現と活性測定

YCy3-12遺伝子の大腸菌での発現は、実施例4に記載された方法と同じT
he QIA expressionist (QIAGEN) を用いて行った。
まずYCy3-12上の糖転移酵素遺伝子の開始コドンの5'側にNcoI認識配
25 列を導入するために、以下に示すプライマーYCy3-12P1 (配列番号53)
とYCy3-12P2 (配列番号54) を用いて実施例4と同様のPCR反応を行
った。

YCy3-12P1) 5' -cccatggagagggcagagctagccttca-3' (配列番号 53)

YCy3-12P2) 5' -aaagcttcacgaagagcgattgagtacttc-3' (配列番号 54)

得られたPCR産物を pCR-BluntII-TOPO vector (INVITROGEN) に製造者が推奨する方法でサブクローニングした。このよう
5 にして得られたプラスミド pTOPO-NCYy3-12とした。PCR反応による
エラーがないことを塩基配列を決定することにより確認した。pTOPO-NCYy
3-12をNcoI、HindIIIで制限酵素処理し得られた約1.8Kbのフ
ラグメントを pQE-61 vectorのNcoI、HindIII部位に連
結し、プラスミド pQE-NCYy3-12を得た。pQE-NCYy3-12をCo
10 mpotent high JM109 に形質転換した。

この大腸菌形質転換株を、実施例5に記載されている方法で培養し、粗酵素液を
得た。これを用いて実施例5に記載されている方法でカルコンを基質とした糖転移
活性を測定した。

NCYy3-12由来の糖転移酵素遺伝子を発現させた大腸菌の抽出液を反応さ
15 せたところ、THC (保持時間27.3分)に加え、19.89分に溶出される新
たな物質が検出された。これはTHCの2'位配糖体の保持時間と一致し、pQE
61 ベクターのみを発現させた大腸菌から同様に調製した粗抽出液を反応させ
たものでは検出されなかったことからNCYy3-12に由来する糖転移酵素によ
って生じた産物と考えられる。以上の結果から、NCYy3-12由来の糖転移酵素
20 はTHCの2'位の水酸基にグルコースを糖転移する活性を有することが確認され
た。

産業上の利用の可能性

本発明は、花卉園芸、植物育種、農業、バイオテクノロジー関連など
25 の産業に適用される。

配列表フリーテキスト

配列番号 3 ; Ipomoea purpurea 3GGT PN3GGTF

配列番号 4 ; Ipomoea purpurea 3GGT PN3GGTR

配列番号 5 ; Gentiana scabra 3GT GT3GTF

配列番号 6 ; Gentiana scabra 3GT GT3GTR

5 配列番号 7 ; Verbena hybrida 5GT H5GTF

配列番号 8 ; Verbena hybrida 5GT H5GTR

配列番号 9 ; Scutellaria baicalensis GT SBGTF

配列番号 10 ; Scutellaria baicalensis GT SBGTR

配列番号 11 ; T170-NcoI PCR primer

10 配列番号 12 ; M13M4 PCR primer

配列番号 13 ; 3-グルコシド糖転移活性を有するタンパク質のアミノ酸配列。

An amino acid sequence of a protein having an activity to transfer glucose to sugar at position 3 of flavonoids

配列番号 22 ; T170F PCR primer

15 配列番号 23 ; T170R PCR primer

配列番号 24 ; CHIF1 PCR primer

配列番号 25 ; CHIR1 PCR primer

配列番号 26 ; T128-NcoI PCR primer

配列番号 27 ; A93-75 BspHI PCR primer

20 配列番号 28 ; A93-75-BglII PCR primer

配列番号 29 ; S6B11-RT-F PCR primer

配列番号 30 ; S6B11-RT-R PCR primer

配列番号 31 ; S12A2-NcoI PCR primer

配列番号 32 ; S12A2-S1 PCR primer

25 配列番号 33 ; S12A2-S2 PCR primer

配列番号 34 ; S12A2-A1 PCR primer

配列番号 35 ; S12A2-A2 PCR primer

- 配列番号 3 6 ; pQE61-f primer
配列番号 3 7 ; pQE61-r primer
配列番号 3 8 ; T128-F PCR Primer
配列番号 3 9 ; T128-R PCR Primer
5 配列番号 4 0 ; PhF3H-ClaI PCR Primer
配列番号 4 1 ; ThF3H-SalI1 PCR Primer
配列番号 4 2 ; ThF3H-SalI2 PCR Primer
配列番号 4 3 ; TpCHI-SalI PCR Primer
配列番号 4 4 ; TpCHI-XbaI1 PCR Primer
10 配列番号 4 5 ; TpCHI-XbaI2 PCR Primer
配列番号 4 6 ; ベクターに挿入されるPacI-FseIF アダプター
PacI-FseIF adapter inserted in a vector
配列番号 4 7 ; ベクターに挿入されるPacI-FseIRアダプター
PacI-FseIR adapter inserted in a vector
15 配列番号 4 8 ; M13RV PCR Primer
配列番号 4 9 ; BamHI-CHI-F PCR Primer
配列番号 5 0 ; Sal-CHI-R PCR Primer
配列番号 5 1 ; Sal-CHI-F PCR Primer
配列番号 5 2 ; EcoRI-CHI-R PCR Primer
20 配列番号 5 3 ; YCy3-12P1 PCR Primer
配列番号 5 4 ; YCy3-12P2 PCR Primer
配列番号 5 7 ; EcoFseI Primer
配列番号 5 8 ; EcoFseR Primer
配列番号 5 9 ; HinFseR Primer
25 配列番号 6 0 ; HinFse3 Primer

請 求 の 範 囲

1. 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列に対して 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換及び／若しくは付加された
5 アミノ酸配列からなり、かつカルコン類の 2' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

2. 配列番号 1 に記載する塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリジェントな条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の 2
10 ' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

3. 配列番号 1 5 に記載のアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列に対して 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換及び／若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつカルコン類の 2' 位に糖を転移する活性
15 を有するタンパク質をコードする遺伝子。

4. 配列番号 1 4 に記載する塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリジェントな条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の 2' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。
20

5. 配列番号 1 7 に記載のアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列に対して 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換及び／若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつカルコン類の 2' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。
25

6. 配列番号 1 6 に記載する塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリジェントな条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の

2' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

7. 配列番号 19 に記載のアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列に対して 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換及び／若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつカルコン類の 2' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

8. 配列番号 18 に記載する塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリジェントな条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の 2' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

9. 配列番号 21 に記載のアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列に対して 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換及び／若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつカルコン類の 2' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

10. 配列番号 20 に記載する塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリジェントな条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の 2' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

11. 配列番号 56 に記載のアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列に対して 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換及び／若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつカルコン類の 2' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

12. 配列番号 55 に記載する塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリジェントな条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類

の 2' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

13. 請求の範囲第 1 項から第 12 項のいずれか一項に記載の遺伝子を含んでなるベクター。

5

14. 請求の範囲第 13 項に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。

15 15. 請求の範囲第 14 項に記載の宿主細胞を培養又は生育させ、当該宿主細胞からカルコン類の 2' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質を採取することを特徴とする当該タンパク質の製造方法。

16. 請求の範囲第 15 項に記載の方法で得られたタンパク質。

15 17. 請求の範囲第 1 項から第 12 項のいずれか一項に記載の遺伝子が導入された植物体若しくは当該植物体の子孫となる植物体、又はそれら植物体の組織。

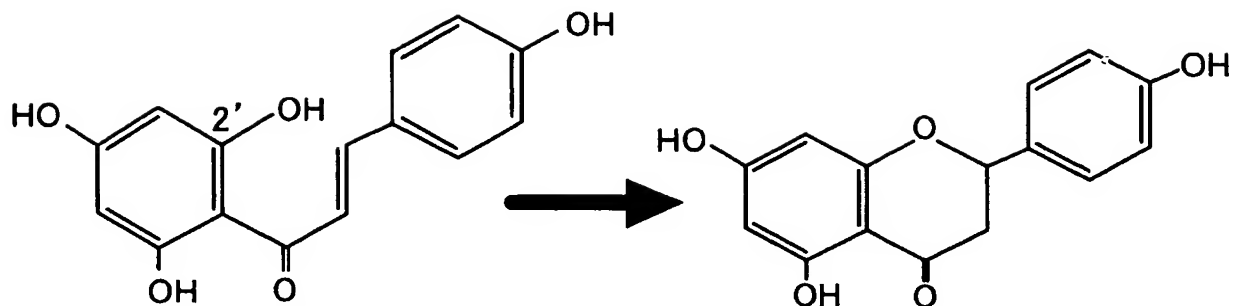
18. 請求の範囲第 17 項に記載の植物体から採取された切り花。

20

19. 請求の範囲第 1 項から第 12 項のいずれか一項に記載の遺伝子を植物体に導入及び発現して花色が改変された植物体、及び当該植物体の子孫となる植物体。

25 20. 改変された花色が黄色であることを特徴とする請求の範囲第 18 項に記載の植物体。

第1図

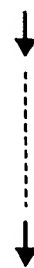


THC
4,2',4',6'- テトラヒドロキシカルコン
(黄色、極めて不安定)

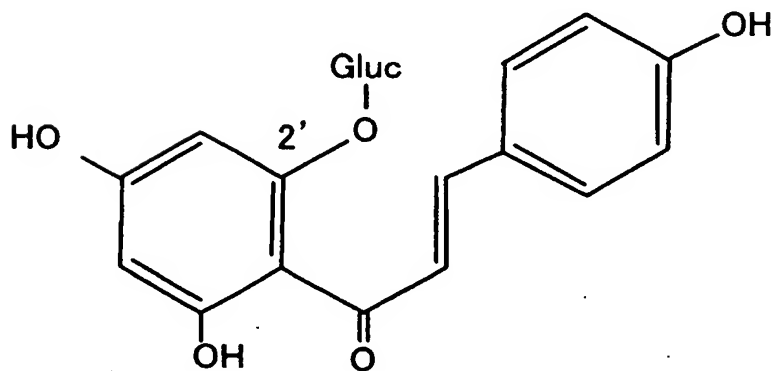
ナリンゲニン
(無色)



カルコン
2'-糖転移酵素



アントシアニン



カルコン 2'-配糖体(黄色、安定)

MG3GGT 1 MG S Q A T T Y H M A M Y P V F G V G H L T G F F R L A N K L A G K G H R I S F L I P K N T Q S K L 50
GGT7 1 M S P V S H V A V L A F F P G T H A L P F L L T V N R L A A S A P D I F S F L P T S S S I T 47
HGT8 1 M S R A H V L L A T F P A Q G H I N P M L O E A K R L A N A D I Q V T F F - T S V Y A W R - 44
SbUFGT 1 M G Q L R I V L I V P M I A H G H M I P M L D M A K L F S S R G V K T T I I A T P A F A E P I 46
H A G H P L A L L A F

MG3GGT 51 E S F N L H P H L I S F V P I - V V P S I P G L P P G A E T T S D V P F P S T H L L M E A M D K T Q 99
GGT7 48 T I F S P T I N L I S I G S N I K P Y A V W D G S L P E G F V F S G N P R E P I E Y F L N A A P D N F D 97
HGT8 45 R M S R T A A G S N G L I N - - F V S F S D G Y D D G L Q P G D D G K N Y M S E M K S R G I K A L S 92
SbUFGT 47 R K A R E S G H D I G L T T T K F P P K G S S L P D N I R S L D Q V T D D L L P H F F R A L E L L Q 96
G P G A

MG3GGT 100 N D I E I I L K D L K V D V V - - F Y D F T H W L P S L A R K I G I K S - V F Y S T I S P L M - 143
GGT7 98 K A M K K A V E D T Q V N I S C L - L T D A F L W F A A D F S E K I G V P W I P V W T A E S C S L C 146
HGT8 93 D T L A A N N V D Q K S S K I T F V Y S H L F A W A A K V A R E F H L R S W L L W I E P A T V L - 141
SbUFGT 97 E P V E E I M E D L K P D C L - - V S D M F L P W T T D S A A K P G I P R - L L F H G T S L F A - 141
D K F W A K G S

MG3GGT 144 H G Y A L S P E R R V V G K Q L T E A D M M K A P A S F I P D P S I K L H A H E A R G F T A R T V M 194
GGT7 147 L H V Y T D E I R S R A E F D I A E K A E K T - I D F I P G L S - A I S F S D L P E E L I M E D S 192
HGT8 142 D I F Y F Y F N G Y S D E I D A G S D A I H L - P G G L P - - V L A Q R D L P S F L L P S T H 185
SbUFGT 143 R C E A E Q M S I Q K P Y K N V S S D S E P F V L R G L P H E V - S F V R T Q I P D Y E L Q E G G 189
P P

MG3GGT 193 K F G G D I T F F D R I F T A V S E S D G I A Y S T C B E I E G Q F C D Y I E T Q F K P V L L A G 242
GGT7 195 Q S I F A L T L H N M G L K L H K A T A V A - V N S F E E I D P I I T N H L R S T N Q L N I L N I G 243
HGT8 186 E R F R S I M K E K I E T L E G E E K P K V I V N S F L A L E P D A L K A I D K Y E M I A I G P L I 235
SbUFGT 190 D D A F S K M A K Q M R D A D K K S Y G D V - I N S F E E L S E Y A D Y N K N V F G K K A W H I G 238
N S F E E

MG3GGT 243 P A L P V P S K S T - - - - - M E Q K W S D W L G K F K E G S V I Y C A F G S E C 278
GGT7 244 P L Q T L S S S I P - - - - - P - - - - - E D N E I C L K W L Q T Q K E S S V V Y L S F G T V I 280
HGT8 236 P S A F L D G K D P S D R S F G G D L F E K G S N D D D E C L E W L S T N P R S V V Y V S F G S F V 285
SbUFGT 239 P L K L F N N R A E Q K S S Q R G K - - E S A I D D H E C L A W L N S K P P N S V V Y M C F G S M A 286
P D C L W L K S V V Y F G S

MG3GGT 279 T L R K D K F O E L L W G L E L T G M P F F A A L K P P F E A E S I E A A I P E E L K E K I Q G R G 328
GGT7 281 N P P P N E M A A L A S T L E S R K I P F L W S L R - - - D E A R K H L P E N F I D R T S T F G K - 326
HGT8 286 N T T K S Q M E E I A R G L L D C G R P F L W V R - - - V N E G E E V L I S C M E E L K R V G K - 331
SbUFGT 287 T F T P A Q L H E T A G L E S S Q D F I W V R - - - N G G E N E D W L P Q G F E E R I K G K G 333
E A G L E G P F W R E

MG3GGT 329 I V H G E W V Q Q Q L F L Q H P S Y G C F V S H C G W A S L S E A L V N D C O I V L L P Q V G D Q I 378
GGT7 327 - - I V S W A P Q L H V L E N P A I G V F V T H C G W N S T L E S I F C R V P V I G R P F Q D Q K 374
HGT8 332 - - I V S W C P Q L E V L T H P S L G C F V T H C G W N S T L E S I F C R V P V I G R P F Q D Q K 379
SbUFGT 334 L M I R G W A P Q V M I L D H P S T G A R V T H C G W N S T L E G I C A G L P M Y T W P V F A E O F 383
I W Q L H P S G F V T H C G W N S T L E I P V P D Q

MG3GGT 379 I N A R I M S V S L K V G V E V E K G E E D G V F S - - R E S V C K A V K A V M D E K S E I G R E V 426
GGT7 375 V N A R M V E D V W K I G V G V - - K G G V F T E - D E T T R - V L E L V L F G S D K - G K E M 416
HGT8 380 T N A K M L E D V W R T G V R V R A N E E G S V V D - G D E I R R C I L E E V M D G G E K - S R K L 426
SbUFGT 384 Y N E K L V T E V L K T G V S V G N K K W Q R V G E G V G S E A V K E A V E R V M V G D G - A A E M 432
N A V K G V V V E

MG3GGT 427 R G N H D K L R G F L L N A - D L D S K Y M D S F N Q K L Q D L L G 439
GGT7 417 R Q N V G R L K E K A K D A V K A G S S T R N F S E S L L A A F N K L D S S 434
HGT8 427 R E S A G K W K D L A R K A M E E D G S S V N N L K V F L D E V V G I 461
SbUFGT 433 R S R A L Y K E M A R A V E E G S S Y N N L N A L I E N W V P L F L L 470
R K A A A G S S N L

1/59

SEQUENCE LISTING

<110> Suntory Limited

Bio-oriented Technology Research Advanced Institution

<120> New glucosyltransferase gene

<130> PSUA-15527

<150> JP2002-239743

<151> 2002-08-20

<150> JP2003-085452

<151> 2003-03-26

<160> 56

<170> PatentIn Ver. 3.1

<210> 1

<211> 1751

<212> DNA

<213> Dianthus caryophyllus cv. light cream candle

<220>

<223> Inventor: NAKAMURA, Noriko

Inventor: FUKUI, Yuko

Inventor: ONO, Eiichiro

Inventor: TANAKA, Yoshikazu

Inventor: OKUHARA, Hiroaki

<220>

<221> CDS

<222> (43).. (1509)

<223> cDNA

<400> 1

ctcgtctaataaactcgaaaagtttatttaa gcgagttcaa ac atg agc aaa gca 54
Met Ser Lys Ala

2/59

ccg ttc gag ttg gta ttc atc cca act ccg gct gta ggt cac att ata	102
Pro Phe Glu Leu Val Phe Ile Pro Thr Pro Ala Val Gly His Ile Ile	
5 10 15 20	
tcg acc gtt caa ctc gct aaa tta att ctt aat aaa aac gat tta atc	150
Ser Thr Val Gln Leu Ala Lys Leu Ile Leu Asn Lys Asn Asp Leu Ile	
25 30 35	
ttt gtt tct att tac gtc atc aac ttt tct atg cac tct tct aaa gtc	198
Phe Val Ser Ile Tyr Val Ile Asn Phe Ser Met His Ser Ser Lys Val	
40 45 50	
aac gcc tac att gac tcc cag tca cgt gat aac ccg tac ccg acc cgt	246
Asn Ala Tyr Ile Asp Ser Gln Ser Arg Asp Asn Pro Tyr Pro Thr Arg	
55 60 65	
ctg act ttc gta tcc ctt ccg ctc ctg cca gac atg ttc gac ccg ttt	294
Leu Thr Phe Val Ser Leu Pro Leu Leu Pro Asp Met Phe Asp Pro Phe	
70 75 80	
tct ccc act caa ttt act gct gcc atc gac ctc cac aag ccg ttc gtt	342
Ser Pro Thr Gln Phe Thr Ala Ala Ile Asp Leu His Lys Pro Phe Val	
85 90 95 100	
aag cag gcg gtt gag gac cga gtt cgg gac ggg ctt ccc aag ccc gtc	390
Lys Gln Ala Val Glu Asp Arg Val Arg Asp Gly Leu Pro Lys Pro Val	
105 110 115	
ggg ttc gtc ctc gac atg ttt tgc acc tca atg gcg gat att gcc aac	438
Gly Phe Val Leu Asp Met Phe Cys Thr Ser Met Ala Asp Ile Ala Asn	
120 125 130	
gag ttg agt gta ccg tcg tac gtt tac ttt act tcg ggt gca aat ctt	486
Glu Leu Ser Val Pro Ser Tyr Val Tyr Phe Thr Ser Gly Ala Asn Leu	
135 140 145	
ctg aat ttc aca ttc ttt gct cag tcg ttc gca gac gat cat caa gaa	534
Leu Asn Phe Thr Phe Phe Ala Gln Ser Phe Ala Asp Asp His Gln Glu	
150 155 160	

atc gat cct gcg gtt gag ttt agt agg ccg gaa ttt tca gcg gtt gtg	582
Ile Asp Pro Ala Val Glu Phe Ser Arg Pro Glu Phe Ser Ala Val Val	
165 170 175 180	
ccc ggg ttt aag aac ccg gtc aca agc gcc gct att cct gcg gtg ttt	630
Pro Gly Phe Lys Asn Pro Val Thr Ser Ala Ala Ile Pro Ala Val Phe	
185 190 195	
caa gag aaa aac ggg tgc gag ttg ctc ctc ggc ttt gcg agg aag ttt	678
Gln Glu Lys Asn Gly Cys Glu Leu Leu Leu Gly Phe Ala Arg Lys Phe	
200 205 210	
aga gaa atg aaa ggt att ttg atg aat acc tat gtg gaa tta gaa aac	726
Arg Glu Met Lys Gly Ile Leu Met Asn Thr Tyr Val Glu Leu Glu Asn	
215 220 225	
ttc ggt ata cat gcg tta atg aat ggt gat ggt aag aaa att ccg cct	774
Phe Gly Ile His Ala Leu Met Asn Gly Asp Gly Lys Lys Ile Pro Pro	
230 235 240	
att tat ccc gtg ggc ccc att ttg gag ctc ggc aac acg agt act ggt	822
Ile Tyr Pro Val Gly Pro Ile Leu Glu Leu Gly Asn Thr Ser Thr Gly	
245 250 255 260	
ggg tct gac aat agt aag gac gtg tcc gta att cag tgg ctt gat ggt	870
Gly Ser Asp Asn Ser Lys Asp Val Ser Val Ile Gln Trp Leu Asp Gly	
265 270 275	
caa ccg aag tca tca gtg gtg ttt ctg tgt ttt gga agt atg gga agt	918
Gln Pro Lys Ser Ser Val Val Phe Leu Cys Phe Gly Ser Met Gly Ser	
280 285 290	
ttt gat gaa gaa caa att aaa gag ata gcg atc ggt cta gaa cgg tcg	966
Phe Asp Glu Glu Gln Ile Lys Glu Ile Ala Ile Gly Leu Glu Arg Ser	
295 300 305	
gga caa cgg tat tta tgg gcc tta cgg aaa ccg cct tct tca gga aag	1014
Gly Gln Arg Tyr Leu Trp Ala Leu Arg Lys Pro Pro Ser Ser Gly Lys	
310 315 320	

gta ggg gtc cct agt gag agt gag gcg ttc tta gag gcc ctt cct gag	1062
Val Gly Val Pro Ser Glu Ser Glu Ala Phe Leu Glu Ala Leu Pro Glu	
325 330 335 340	
ggg ttc att gat cgt acg atc agt ggt aag ggg aaa atc ata gcg tgg	1110
Gly Phe Ile Asp Arg Thr Ile Ser Gly Lys Gly Lys Ile Ile Ala Trp	
345 350 355	
gcc ccg cag gtt gag gta tta gcc cac cct gcc gta gga ggg ttc gtg	1158
Ala Pro Gln Val Glu Val Leu Ala His Pro Ala Val Gly Gly Phe Val	
360 365 370	
tta cac tgt ggg tgg aac tcg acg ttg gag agc ata tgg ttt ggg gtt	1206
Leu His Cys Gly Trp Asn Ser Thr Leu Glu Ser Ile Trp Phe Gly Val	
375 380 385	
ccc atg gca act tgg cct att tat gcg gaa cag cag ctg aac gcg ttt	1254
Pro Met Ala Thr Trp Pro Ile Tyr Ala Glu Gln Gln Leu Asn Ala Phe	
390 395 400	
gag tta gta aag gag ttg gaa ttg gca att gaa ata agg atg gat tac	1302
Glu Leu Val Lys Glu Leu Glu Leu Ala Ile Glu Ile Arg Met Asp Tyr	
405 410 415 420	
aaa acg gat ata gaa act caa aag gcg ggc ttc atg gta aag gcc gag	1350
Lys Thr Asp Ile Glu Thr Gln Lys Ala Gly Phe Met Val Lys Ala Glu	
425 430 435	
gag ata gaa gaa gga att agg gca tta atg aat gtg gat gag acg atg	1398
Glu Ile Glu Glu Gly Ile Arg Ala Leu Met Asn Val Asp Glu Thr Met	
440 445 450	
cgt gaa cga gtc aag acg atg agt gac tat ggc aaa aag gct ttg gaa	1446
Arg Glu Arg Val Lys Thr Met Ser Asp Tyr Gly Lys Lys Ala Leu Glu	
455 460 465	
cga gga gga tcg tcc tat aat tat ttg gaa ttc ttc att ggg gat gtt	1494
Arg Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Tyr Leu Glu Phe Phe Ile Gly Asp Val	
470 475 480	

5/59

ttg agc aat att agt taaattaaat tccaagagag tggatgaaaa tttaaaaaaa 1549
 Leu Ser Asn Ile Ser
 485

aaatgataag ttattgctct ctgcaatcat gtacggagta atttttaaca tttactattg 1609

aatcggtttt ttttaattaa agcatagtgt taaatttact taggtacctc tatattgtaa 1669

atgaagaagt tgatgacgat ttgatgtcag atataaaata aatgaatgga gtaaaaaaaaa 1729

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1751

<210> 2

<211> 489

<212> PRT

<213> *Dianthus caryophyllus* cv. light cream candle

<400> 2

Met Ser Lys Ala Pro Phe Glu Leu Val Phe Ile Pro Thr Pro Ala Val
 1 5 10 15

Gly His Ile Ile Ser Thr Val Gln Leu Ala Lys Leu Ile Leu Asn Lys
 20 25 30

Asn Asp Leu Ile Phe Val Ser Ile Tyr Val Ile Asn Phe Ser Met His
 35 40 45

Ser Ser Lys Val Asn Ala Tyr Ile Asp Ser Gln Ser Arg Asp Asn Pro
 50 55 60

Tyr Pro Thr Arg Leu Thr Phe Val Ser Leu Pro Leu Leu Pro Asp Met
 65 70 75 80

Phe Asp Pro Phe Ser Pro Thr Gln Phe Thr Ala Ala Ile Asp Leu His
 85 90 95

Lys Pro Phe Val Lys Gln Ala Val Glu Asp Arg Val Arg Asp Gly Leu
 100 105 110

6/59

Pro Lys Pro Val Gly Phe Val Leu Asp Met Phe Cys Thr Ser Met Ala
 115 120 125

Asp Ile Ala Asn Glu Leu Ser Val Pro Ser Tyr Val Tyr Phe Thr Ser
 130 135 140

Gly Ala Asn Leu Leu Asn Phe Thr Phe Phe Ala Gln Ser Phe Ala Asp
 145 150 155 160

Asp His Gln Glu Ile Asp Pro Ala Val Glu Phe Ser Arg Pro Glu Phe
 165 170 175

Ser Ala Val Val Pro Gly Phe Lys Asn Pro Val Thr Ser Ala Ala Ile
 180 185 190

Pro Ala Val Phe Gln Glu Lys Asn Gly Cys Glu Leu Leu Leu Gly Phe
 195 200 205

Ala Arg Lys Phe Arg Glu Met Lys Gly Ile Leu Met Asn Thr Tyr Val
 210 215 220

Glu Leu Glu Asn Phe Gly Ile His Ala Leu Met Asn Gly Asp Gly Lys
 225 230 235 240

Lys Ile Pro Pro Ile Tyr Pro Val Gly Pro Ile Leu Glu Leu Gly Asn
 245 250 255

Thr Ser Thr Gly Gly Ser Asp Asn Ser Lys Asp Val Ser Val Ile Gln
 260 265 270

Trp Leu Asp Gly Gln Pro Lys Ser Ser Val Val Phe Leu Cys Phe Gly
 275 280 285

Ser Met Gly Ser Phe Asp Glu Glu Gln Ile Lys Glu Ile Ala Ile Gly
 290 295 300

Leu Glu Arg Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Trp Ala Leu Arg Lys Pro Pro
 305 310 315 320

7/59

Ser Ser Gly Lys Val Gly Val Pro Ser Glu Ser Glu Ala Phe Leu Glu
325 330 335

Ala Leu Pro Glu Gly Phe Ile Asp Arg Thr Ile Ser Gly Lys Gly Lys
340 345 350

Ile Ile Ala Trp Ala Pro Gln Val Glu Val Leu Ala His Pro Ala Val
355 360 365

Gly Gly Phe Val Leu His Cys Gly Trp Asn Ser Thr Leu Glu Ser Ile
370 375 380

Trp Phe Gly Val Pro Met Ala Thr Trp Pro Ile Tyr Ala Glu Gln Gln
385 390 395 400

Leu Asn Ala Phe Glu Leu Val Lys Glu Leu Glu Leu Ala Ile Glu Ile
405 410 415

Arg Met Asp Tyr Lys Thr Asp Ile Glu Thr Gln Lys Ala Gly Phe Met
420 425 430

Val Lys Ala Glu Glu Ile Glu Glu Gly Ile Arg Ala Leu Met Asn Val
435 440 445

Asp Glu Thr Met Arg Glu Arg Val Lys Thr Met Ser Asp Tyr Gly Lys
450 455 460

Lys Ala Leu Glu Arg Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Tyr Leu Glu Phe Phe
465 470 475 480

Ile Gly Asp Val Leu Ser Asn Ile Ser
485

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

8/59

<223> Description of Artificial Sequence:Ipomoea
purpurea 3GGT PN3GGTF

<400> 3

gaaatggtcg gattggctgg g

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Ipomoea
purpurea 3GGT PN3GGTR

<400> 4

acctccaccc caactttcag g

21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Gentiana scabra
3GT GT3GTF

<400> 5

tgcttcaaatt ggcttcaaac t

21

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Gentiana scabra

9/59

3GT GT3GTR

<400> 6

ccacctttca ccccaacccc

20

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Verbena hybrida
5GT H5GTF

<400> 7

tgcctcgaat ggttgagcac g

21

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Verbena hybrida
5GT H5GTR

<400> 8

ctctcactct cacacccg

18

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Scutellaria
baicalensis GT SBGTF

10/59

<400> 9

cacgaatgct tagcatggct c

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Scutellaria
baicalensis GT SBGTR

<400> 10

cttattgccc actgaaaccc c

21

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T170-NcoI PCR
primer

<400> 11

agttcaacca tgggcaaagc ac

22

<210> 12

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:M13M4 PCR
primer

11/59

<400> 12

gttttcccag tcacgac

17

<210> 13

<211> 459

<212> PRT

<213> Ipomoea purpurea

<220>

<223> An amino acid sequence of a protein having an activity to transfer
glucose to sugar at position 3 of flavonoids

<400> 13

Met Gly Ser Gln Ala Thr Thr Tyr His Met Ala Met Tyr Pro Trp Phe
1 5 10 15

Gly Val Gly His Leu Thr Gly Phe Phe Arg Leu Ala Asn Lys Leu Ala
20 25 30

Gly Lys Gly His Arg Ile Ser Phe Leu Ile Pro Lys Asn Thr Gln Ser
35 40 45

Lys Leu Glu Ser Phe Asn Leu His Pro His Leu Ile Ser Phe Val Pro
50 55 60

Ile Val Val Pro Ser Ile Pro Gly Leu Pro Pro Gly Ala Glu Thr Thr
65 70 75 80

Ser Asp Val Pro Phe Pro Ser Thr His Leu Leu Met Glu Ala Met Asp
85 90 95

Lys Thr Gln Asn Asp Ile Glu Ile Ile Leu Lys Asp Leu Lys Val Asp
100 105 110

Val Val Phe Tyr Asp Phe Thr His Trp Leu Pro Ser Leu Ala Arg Lys
115 120 125

Ile Gly Ile Lys Ser Val Phe Tyr Ser Thr Ile Ser Pro Leu Met His
130 135 140

12/59

Gly Tyr Ala Leu Ser Pro Glu Arg Arg Val Val Gly Lys Gln Leu Thr
 145 150 155 160

Glu Ala Asp Met Met Lys Ala Pro Ala Ser Phe Pro Asp Pro Ser Ile
 165 170 175

Lys Leu His Ala His Glu Ala Arg Gly Phe Thr Ala Arg Thr Val Met
 180 185 190

Lys Phe Gly Gly Asp Ile Thr Phe Phe Asp Arg Ile Phe Thr Ala Val
 195 200 205

Ser Glu Ser Asp Gly Leu Ala Tyr Ser Thr Cys Arg Glu Ile Glu Gly
 210 215 220

Gln Phe Cys Asp Tyr Ile Glu Thr Gln Phe Gln Lys Pro Val Leu Leu
 225 230 235 240

Ala Gly Pro Ala Leu Pro Val Pro Ser Lys Ser Thr Met Glu Gln Lys
 245 250 255

Trp Ser Asp Trp Leu Gly Lys Phe Lys Glu Gly Ser Val Ile Tyr Cys
 260 265 270

Ala Phe Gly Ser Glu Cys Thr Leu Arg Lys Asp Lys Phe Gln Glu Leu
 275 280 285

Leu Trp Gly Leu Glu Leu Thr Gly Met Pro Phe Phe Ala Ala Leu Lys
 290 295 300

Pro Pro Phe Glu Thr Glu Ser Val Glu Ala Ala Ile Pro Glu Glu Leu
 305 310 315 320

Lys Glu Lys Ile Gln Gly Arg Gly Ile Val His Gly Glu Trp Val Gln
 325 330 335

Gln Gln Leu Phe Leu Gln His Pro Ser Val Gly Cys Phe Val Ser His
 340 345 350

13/59

Cys Gly Trp Ala Ser Leu Ser Glu Ala Leu Val Asn Asp Cys Gln Ile
 355 360 365

Val Leu Leu Pro Gln Val Gly Asp Gln Ile Ile Asn Ala Arg Ile Met
 370 375 380

Ser Val Ser Leu Lys Val Gly Val Glu Val Glu Lys Gly Glu Glu Asp
 385 390 395 400

Gly Val Phe Ser Arg Glu Ser Val Cys Lys Ala Val Lys Ala Val Met
 405 410 415

Asp Glu Lys Ser Glu Ile Gly Arg Glu Val Arg Gly Asn His Asp Lys
 420 425 430

Leu Arg Gly Phe Leu Met Asn Ala Asp Leu Asp Ser Lys Tyr Met Asp
 435 440 445

Ser Phe Asn Gln Lys Leu Gln Asp Leu Leu Gly
 450 455

<210> 14

<211> 1642

<212> DNA

<213> Dianthus caryophyllus cv. light cream candle

<220>

<221> CDS

<222> (45).. (1511)

<223> cCNA

<400> 14

cttaaactca tcaatcaata agtaccaaaa gaacaatttc agat atg ggc act gaa 56
 Met Gly Thr Glu
 1

cct caa aga cta cat gtt gtg ttc ttc ccg ctt atg gcc gcg ggt cac 104
 Pro Gln Arg Leu His Val Val Phe Phe Pro Leu Met Ala Ala Gly His

14/59

5	10	15	20	
atg atc ccg act tta gac att gca aag cta ttc gcg gca cac cac gtc				152
Met Ile Pro Thr Leu Asp Ile Ala Lys Leu Phe Ala Ala His His Val				
	25	30	35	
aaa acc acc atc gtt acc acc cct tta aac gca ccg act ttt ctc aag				200
Lys Thr Thr Ile Val Thr Thr Pro Leu Asn Ala Pro Thr Phe Leu Lys				
	40	45	50	
cca tta cag tcc tac aca aac atc ggc cct cca atc gat gtc caa gtc				248
Pro Leu Gln Ser Tyr Thr Asn Ile Gly Pro Pro Ile Asp Val Gln Val				
	55	60	65	
att ccg ttc cct gct aag gag gct ggt ctc cct gag gga gtc gag aac				296
Ile Pro Phe Pro Ala Lys Glu Ala Gly Leu Pro Glu Gly Val Glu Asn				
	70	75	80	
ttc gag cat ttc aca tca gat gag atg tcg ttg aag ttt ctg aaa gca				344
Phe Glu His Phe Thr Ser Asp Glu Met Ser Leu Lys Phe Leu Lys Ala				
85	90	95	100	
gcc gag tta cta gaa gaa cct ctt ata caa gta ctt gag agg tgt aac				392
Ala Glu Leu Leu Glu Glu Pro Leu Ile Gln Val Leu Glu Arg Cys Asn				
	105	110	115	
cct aag gct gac tgc tta gtt gct gat atg ctg ctt ccg ttt gcg aca				440
Pro Lys Ala Asp Cys Leu Val Ala Asp Met Leu Leu Pro Phe Ala Thr				
	120	125	130	
gaa gtc gcg gct aag ttt gat att ccg agg ctg gtt ttc cat ggc agt				488
Glu Val Ala Ala Lys Phe Asp Ile Pro Arg Leu Val Phe His Gly Ser				
	135	140	145	
tgc tgt ttt gcg ctt agt gtc atg gac gct ttc atc aaa tat cag cct				536
Cys Cys Phe Ala Leu Ser Val Met Asp Ala Phe Ile Lys Tyr Gln Pro				
	150	155	160	
cat aaa gat gtt tcg aac gat gat gaa gaa ttc gtc atc cct cat ctt				584
His Lys Asp Val Ser Asn Asp Asp Glu Glu Phe Val Ile Pro His Leu				

15/59

165	170	175	180	
ccc cac gag atc aag att acg aga atg caa ttg aat gag ggg gtt aaa				632
Pro His Glu Ile Lys Ile Thr Arg Met Gln Leu Asn Glu Gly Val Lys				
	185	190	195	
cag aac aaa caa gac act atg tgg atg gac gtg tta ggc agg gca ctc				680
Gln Asn Lys Gln Asp Thr Met Trp Met Asp Val Leu Gly Arg Ala Leu				
	200	205	210	
gag tct gaa att aag agt tat ggt gta att gtt aac agc ttt tac gag				728
Glu Ser Glu Ile Lys Ser Tyr Gly Val Ile Val Asn Ser Phe Tyr Glu				
	215	220	225	
tta gaa ccc gag tat gct gat ttc tac agg aaa gta atg ggt cgg aaa				776
Leu Glu Pro Glu Tyr Ala Asp Phe Tyr Arg Lys Val Met Gly Arg Lys				
	230	235	240	
acg tgg caa atc ggt cct gtt tcc ttg tgt aat cga gaa aac gaa gct				824
Thr Trp Gln Ile Gly Pro Val Ser Leu Cys Asn Arg Glu Asn Glu Ala				
	245	250	255	260
aag ttt caa aga ggt aaa gac tct tcc att gat gag aac gcg tgc tta				872
Lys Phe Gln Arg Gly Lys Asp Ser Ser Ile Asp Glu Asn Ala Cys Leu				
	265	270	275	
aaa tgg ctc gac tct aag aag ccg aac tca gtc att tac gta tgc ttt				920
Lys Trp Leu Asp Ser Lys Lys Pro Asn Ser Val Ile Tyr Val Cys Phe				
	280	285	290	
ggt agc tta acc gaa gtc tca ctg tta caa ctt cac gag atc gca aaa				968
Gly Ser Leu Thr Glu Val Ser Leu Leu Gln Leu His Glu Ile Ala Lys				
	295	300	305	
ggg tta gaa gcg tct gag caa aat ttc gta tgg gtg att agg aga agt				1016
Gly Leu Glu Ala Ser Glu Gln Asn Phe Val Trp Val Ile Arg Arg Ser				
	310	315	320	
aac acg aac ggt gaa gaa aca gaa gat atc ttc cca aaa ggg ttt gaa				1064
Asn Thr Asn Gly Glu Glu Thr Glu Asp Ile Phe Pro Lys Gly Phe Glu				

16/59

325	330	335	340	
gag cgt acg aaa ggt aag gga cta att ata agg ggt tgg gcc cca caa				1112
Glu Arg Thr Lys Gly Lys Gly Leu Ile Ile Arg Gly Trp Ala Pro Gln				
	345	350	355	
gta cta att tta gac cac gag gcc gta gga gga ttc gtg aca cac tgt				1160
Val Leu Ile Leu Asp His Glu Ala Val Gly Gly Phe Val Thr His Cys				
	360	365	370	
gga tgg aac tca act ctg gag ggt atc tcg tgt ggg gta cct atg gtc				1208
Gly Trp Asn Ser Thr Leu Glu Gly Ile Ser Cys Gly Val Pro Met Val				
	375	380	385	
act tgg ccc gca ttt gct gag caa ttt tac atc gaa aaa ttg gtg acc				1256
Thr Trp Pro Ala Phe Ala Glu Gln Phe Tyr Ile Glu Lys Leu Val Thr				
	390	395	400	
gag att ttg aag acg ggc att cct gtt ggg tcg aaa cat tgg aat aga				1304
Glu Ile Leu Lys Thr Gly Ile Pro Val Gly Ser Lys His Trp Asn Arg				
405	410	415	420	
acg atc gag tgt aac gta aaa tgg gaa gat ata aag gaa gtt gta aga				1352
Thr Ile Glu Cys Asn Val Lys Trp Glu Asp Ile Lys Glu Val Val Arg				
	425	430	435	
aga tta atg gtt gaa gaa gag ggt atg gag ata aga agt agg gca ttg				1400
Arg Leu Met Val Glu Glu Glu Gly Met Glu Ile Arg Ser Arg Ala Leu				
	440	445	450	
aag tta aag aat atg gca aga aag gct att gat gaa ggt ggt tca tct				1448
Lys Leu Lys Asn Met Ala Arg Lys Ala Ile Asp Glu Gly Gly Ser Ser				
	455	460	465	
tat gtt gaa ttg act tct ttg atc caa gaa tta agc aat tgt aag ctt				1496
Tyr Val Glu Leu Thr Ser Leu Ile Gln Glu Leu Ser Asn Cys Lys Leu				
	470	475	480	
aat agt aat ggt ttt tagtcttctt tccatgaatt gaatgagctt tctatgtctt				1551
Asn Ser Asn Gly Phe				

17/59

485

tattttttca tcatttacct ttattttatc agatttgta caagaaattc aagttatttg 1611

gtgtcattat ttcagggcta attttatgaa a 1642

<210> 15

<211> 489

<212> PRT

<213> Dianthus caryophyllus cv. light cream candle

<400> 15

Met Gly Thr Glu Pro Gln Arg Leu His Val Val Phe Phe Pro Leu Met
1 5 10 15

Ala Ala Gly His Met Ile Pro Thr Leu Asp Ile Ala Lys Leu Phe Ala
20 25 30

Ala His His Val Lys Thr Thr Ile Val Thr Thr Pro Leu Asn Ala Pro
35 40 45

Thr Phe Leu Lys Pro Leu Gln Ser Tyr Thr Asn Ile Gly Pro Pro Ile
50 55 60

Asp Val Gln Val Ile Pro Phe Pro Ala Lys Glu Ala Gly Leu Pro Glu
65 70 75 80

Gly Val Glu Asn Phe Glu His Phe Thr Ser Asp Glu Met Ser Leu Lys
85 90 95

Phe Leu Lys Ala Ala Glu Leu Leu Glu Glu Pro Leu Ile Gln Val Leu
100 105 110

18/59

Glu Arg Cys Asn Pro Lys Ala Asp Cys Leu Val Ala Asp Met Leu Leu
115 120 125

Pro Phe Ala Thr Glu Val Ala Ala Lys Phe Asp Ile Pro Arg Leu Val
130 135 140

Phe His Gly Ser Cys Cys Phe Ala Leu Ser Val Met Asp Ala Phe Ile
145 150 155 160

Lys Tyr Gln Pro His Lys Asp Val Ser Asn Asp Asp Glu Glu Phe Val
165 170 175

Ile Pro His Leu Pro His Glu Ile Lys Ile Thr Arg Met Gln Leu Asn
180 185 190

Glu Gly Val Lys Gln Asn Lys Gln Asp Thr Met Trp Met Asp Val Leu
195 200 205

Gly Arg Ala Leu Glu Ser Glu Ile Lys Ser Tyr Gly Val Ile Val Asn
210 215 220

Ser Phe Tyr Glu Leu Glu Pro Glu Tyr Ala Asp Phe Tyr Arg Lys Val
225 230 235 240

Met Gly Arg Lys Thr Trp Gln Ile Gly Pro Val Ser Leu Cys Asn Arg
245 250 255

Glu Asn Glu Ala Lys Phe Gln Arg Gly Lys Asp Ser Ser Ile Asp Glu
260 265 270

19/59

Asn Ala Cys Leu Lys Trp Leu Asp Ser Lys Lys Pro Asn Ser Val Ile
275 280 285

Tyr Val Cys Phe Gly Ser Leu Thr Glu Val Ser Leu Leu Gln Leu His
290 295 300

Glu Ile Ala Lys Gly Leu Glu Ala Ser Glu Gln Asn Phe Val Trp Val
305 310 315 320

Ile Arg Arg Ser Asn Thr Asn Gly Glu Glu Thr Glu Asp Ile Phe Pro
325 330 335

Lys Gly Phe Glu Glu Arg Thr Lys Gly Lys Gly Leu Ile Ile Arg Gly
340 345 350

Trp Ala Pro Gln Val Leu Ile Leu Asp His Glu Ala Val Gly Gly Phe
355 360 365

Val Thr His Cys Gly Trp Asn Ser Thr Leu Glu Gly Ile Ser Cys Gly
370 375 380

Val Pro Met Val Thr Trp Pro Ala Phe Ala Glu Gln Phe Tyr Ile Glu
385 390 395 400

Lys Leu Val Thr Glu Ile Leu Lys Thr Gly Ile Pro Val Gly Ser Lys
405 410 415

His Trp Asn Arg Thr Ile Glu Cys Asn Val Lys Trp Glu Asp Ile Lys
420 425 430

20/59

Glu Val Val Arg Arg Leu Met Val Glu Glu Glu Gly Met Glu Ile Arg
 435 440 445

Ser Arg Ala Leu Lys Leu Lys Asn Met Ala Arg Lys Ala Ile Asp Glu
 450 455 460

Gly Gly Ser Ser Tyr Val Glu Leu Thr Ser Leu Ile Gln Glu Leu Ser
 465 470 475 480

Asn Cys Lys Leu Asn Ser Asn Gly Phe
 485

<210> 16

<211> 1993

<212> DNA

<213> *Dianthus caryophyllus* cv. light cream candle

<220>

<221> CDS

<222> (410)..(1852)

<223> cDNA

<400> 16

tccttctgaa tgttgtagtc agcaagagtg cggccgtcct cgagttgctt tccagcgaag	60
atcagacggtt gctggctctgg ggggatccct tccttgctct ggattttggt tttgacattg	120
tcgattgtgt cggaactctc gacctcgaga gtgattgtct tgcctgtgag ggtcttaacg	180
aagatttgca tcttgaaaga aggattaaaa tcgagaggaa gattgattag agaatttgga	240
gagaaaattg attgaattat aagaagttga gaattgagct cgtgccgaat tcggcacgag	300

21/59

atcaaacatc aattacacag aaataacaac aacaacaaaa caacaacaac aacaacaaaa 360

caactcttta ttaatccatc aaattaccaa aaaaaaaata tacaggatc atg tct tca 418
Met Ser Ser
1

ggg tta gta ttc att cct aca ccg ggt atg ggt cac ctt gta tcc gcc 466
Gly Leu Val Phe Ile Pro Thr Pro Gly Met Gly His Leu Val Ser Ala
5 10 15

atc gag ctc gcc aaa cac gtc ctt cgt acc aat aat ttc atc tcc ata 514
Ile Glu Leu Ala Lys His Val Leu Arg Thr Asn Asn Phe Ile Ser Ile
20 25 30 35

tcc att ctt att ctc aac att ccg agc cat tcc tcc aaa att acg ggc 562
Ser Ile Leu Ile Leu Asn Ile Pro Ser His Ser Ser Lys Ile Thr Gly
40 45 50

ttc gtc gac tcc cag tca cgt aac aac cca tac ccg act cgt tta aca 610
Phe Val Asp Ser Gln Ser Arg Asn Asn Pro Tyr Pro Thr Arg Leu Thr
55 60 65

ttt gtc acc ctc ccg ccc tta tca gac cca cct gac atg gcg ggt acc 658
Phe Val Thr Leu Pro Pro Leu Ser Asp Pro Pro Asp Met Ala Gly Thr
70 75 80

ccg cac ttc tcg tcg gtc atc cac ctt cac aag ccg atc gtg aag cag 706
Pro His Phe Ser Ser Val Ile His Leu His Lys Pro Ile Val Lys Gln
85 90 95

gcc att gag gac cgt gtt cga gat ggg ttg ttt aaa cct gtc ggg ttt 754
Ala Ile Glu Asp Arg Val Arg Asp Gly Leu Phe Lys Pro Val Gly Phe
100 105 110 115

gtt gtc gac atg ttt tgc gct gaa atg gtt gat ctt gct aat gag atg 802
Val Val Asp Met Phe Cys Ala Glu Met Val Asp Leu Ala Asn Glu Met
120 125 130

aat gtt ccg acc tac ctt ttc ttt act tcg ggt gca agt ttt ttg aac 850
Asn Val Pro Thr Tyr Leu Phe Phe Thr Ser Gly Ala Ser Phe Leu Asn

22/59

135	140	145	
ttc ttg ttg tat gct cag tca ctg gcg gat gat cat ccc gag att gat			898
Phe Leu Leu Tyr Ala Gln Ser Leu Ala Asp Asp His Pro Glu Ile Asp			
150	155	160	
atc gtg agg gag ttt agt agg cgg gat ttt tct gcg ctt gtg ccc ggg			946
Ile Val Arg Glu Phe Ser Arg Arg Asp Phe Ser Ala Leu Val Pro Gly			
165	170	175	
ttt cag aac ccg gtc acg agc aat gtt att ccc gct ctc ttg cag gag			994
Phe Gln Asn Pro Val Thr Ser Asn Val Ile Pro Ala Leu Leu Gln Glu			
180	185	190	195
aag agc ggg tgt gaa ttg ctc ctc aac ttc gcg agg aag ttt agg gaa			1042
Lys Ser Gly Cys Glu Leu Leu Leu Asn Phe Ala Arg Lys Phe Arg Glu			
200	205	210	
atg aag ggt att ttg gtg aac acg tat gcg gaa ttg gaa ccg tat ggt			1090
Met Lys Gly Ile Leu Val Asn Thr Tyr Ala Glu Leu Glu Pro Tyr Gly			
215	220	225	
ctc cag gcg ttg gcc aaa ggt gac ggt aaa aga att ccg ccg gtt tat			1138
Leu Gln Ala Leu Ala Lys Gly Asp Gly Lys Arg Ile Pro Pro Val Tyr			
230	235	240	
ccc gtg ggg ccc att ttg gag cta cat aaa aag agc ggt cgt ggg acc			1186
Pro Val Gly Pro Ile Leu Glu Leu His Lys Lys Ser Gly Arg Gly Thr			
245	250	255	
acc agt atg gat gag tct gtg att cag tgg ctc gac gct caa ccg gag			1234
Thr Ser Met Asp Glu Ser Val Ile Gln Trp Leu Asp Ala Gln Pro Glu			
260	265	270	275
tcg tcg gtg gtg ttt ctg tgt ttt gga agc tgg gga agt ttc gat gag			1282
Ser Ser Val Val Phe Leu Cys Phe Gly Ser Trp Gly Ser Phe Asp Glu			
280	285	290	
gag cag att aaa gag ata gcc aat ggt cta gaa caa tcg gga cat cgg			1330
Glu Gln Ile Lys Glu Ile Ala Asn Gly Leu Glu Gln Ser Gly His Arg			

23/59

295	300	305	
ttt ttg tgg gcc cta aga aag ccg cct ccc aag gga aag tta gca gca			1378
Phe Leu Trp Ala Leu Arg Lys Pro Pro Pro Lys Gly Lys Leu Ala Ala			
310	315	320	
cct agc gac aac gag ccg tac gta gag gcc ctc ccg gaa ggg ttc ctt			1426
Pro Ser Asp Asn Glu Pro Tyr Val Glu Ala Leu Pro Glu Gly Phe Leu			
325	330	335	
gag cga acg agt ggt cgc ggg aaa atc gta gcg tgg gcc cca cag gtc			1474
Glu Arg Thr Ser Gly Arg Gly Lys Ile Val Ala Trp Ala Pro Gln Val			
340	345	350	355
gag gtg tta gca cac cgt gct ata ggt gga ttc gta tca cat tgt ggg			1522
Glu Val Leu Ala His Arg Ala Ile Gly Gly Phe Val Ser His Cys Gly			
360	365	370	
tgg aat tcc acg tta gag agt ttg tgg ttt ggg gtt ccc atg gca acg			1570
Trp Asn Ser Thr Leu Glu Ser Leu Trp Phe Gly Val Pro Met Ala Thr			
375	380	385	
tgg ccc atg tat gca gag caa cag atg aac gcg ttt gag ctt gtg aaa			1618
Trp Pro Met Tyr Ala Glu Gln Gln Met Asn Ala Phe Glu Leu Val Lys			
390	395	400	
gat ttg aat tta gca gtc gag ata aga atg gat tat aaa agg gac ttg			1666
Asp Leu Asn Leu Ala Val Glu Ile Arg Met Asp Tyr Lys Arg Asp Leu			
405	410	415	
gta atg gga aaa agt aat ttt gca gtg acc gcc gag gag att gaa aat			1714
Val Met Gly Lys Ser Asn Phe Ala Val Thr Ala Glu Glu Ile Glu Asn			
420	425	430	435
gga gtt aaa aca ttg atg aat gcg gat gga aag cta aga agt aga gta			1762
Gly Val Lys Thr Leu Met Asn Ala Asp Gly Lys Leu Arg Ser Arg Val			
440	445	450	
acg aaa atg agc gaa gaa ggt aga aaa gct ttg gaa gaa gga gga tcg			1810
Thr Lys Met Ser Glu Glu Gly Arg Lys Ala Leu Glu Glu Gly Gly Ser			

24/59

455	460	465	
tcg cat gac aat tta gaa cat ttc att gaa gat gtt ctt caa			1852
Ser His Asp Asn Leu Glu His Phe Ile Glu Asp Val Leu Gln			
470	475	480	
taa atcatca tcatttgttg atattttgat aatttttttg ttttttttagt ctacagtaat			1912
gatgatatta ggtaaatgta atcattttta ctacggagta ctcacgtata ttagaatcca			1972
tttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a			1993

<210> 17

<211> 481

<212> PRT

<213> Dianthus caryophyllus cv. light cream candle

<400> 17

Met	Ser	Ser	Gly	Leu	Val	Phe	Ile	Pro	Thr	Pro	Gly	Met	Gly	His	Leu
1				5					10					15	

Val	Ser	Ala	Ile	Glu	Leu	Ala	Lys	His	Val	Leu	Arg	Thr	Asn	Asn	Phe
			20					25					30		

Ile	Ser	Ile	Ser	Ile	Leu	Ile	Leu	Asn	Ile	Pro	Ser	His	Ser	Ser	Lys
	35					40						45			

Ile	Thr	Gly	Phe	Val	Asp	Ser	Gln	Ser	Arg	Asn	Asn	Pro	Tyr	Pro	Thr
	50					55						60			

Arg	Leu	Thr	Phe	Val	Thr	Leu	Pro	Pro	Leu	Ser	Asp	Pro	Pro	Asp	Met
65						70				75				80	

25/59

Ala Gly Thr Pro His Phe Ser Ser Val Ile His Leu His Lys Pro Ile
85 90 95

Val Lys Gln Ala Ile Glu Asp Arg Val Arg Asp Gly Leu Phe Lys Pro
100 105 110

Val Gly Phe Val Val Asp Met Phe Cys Ala Glu Met Val Asp Leu Ala
115 120 125

Asn Glu Met Asn Val Pro Thr Tyr Leu Phe Phe Thr Ser Gly Ala Ser
130 135 140

Phe Leu Asn Phe Leu Leu Tyr Ala Gln Ser Leu Ala Asp Asp His Pro
145 150 155 160

Glu Ile Asp Ile Val Arg Glu Phe Ser Arg Arg Asp Phe Ser Ala Leu
165 170 175

Val Pro Gly Phe Gln Asn Pro Val Thr Ser Asn Val Ile Pro Ala Leu
180 185 190

Leu Gln Glu Lys Ser Gly Cys Glu Leu Leu Leu Asn Phe Ala Arg Lys
195 200 205

Phe Arg Glu Met Lys Gly Ile Leu Val Asn Thr Tyr Ala Glu Leu Glu
210 215 220

Pro Tyr Gly Leu Gln Ala Leu Ala Lys Gly Asp Gly Lys Arg Ile Pro
225 230 235 240

26/59

Pro Val Tyr Pro Val Gly Pro Ile Leu Glu Leu His Lys Lys Ser Gly
245 250 255

Arg Gly Thr Thr Ser Met Asp Glu Ser Val Ile Gln Trp Leu Asp Ala
260 265 270

Gln Pro Glu Ser Ser Val Val Phe Leu Cys Phe Gly Ser Trp Gly Ser
275 280 285

Phe Asp Glu Glu Gln Ile Lys Glu Ile Ala Asn Gly Leu Glu Gln Ser
290 295 300

Gly His Arg Phe Leu Trp Ala Leu Arg Lys Pro Pro Pro Lys Gly Lys
305 310 315 320

Leu Ala Ala Pro Ser Asp Asn Glu Pro Tyr Val Glu Ala Leu Pro Glu
325 330 335

Gly Phe Leu Glu Arg Thr Ser Gly Arg Gly Lys Ile Val Ala Trp Ala
340 345 350

Pro Gln Val Glu Val Leu Ala His Arg Ala Ile Gly Gly Phe Val Ser
355 360 365

His Cys Gly Trp Asn Ser Thr Leu Glu Ser Leu Trp Phe Gly Val Pro
370 375 380

Met Ala Thr Trp Pro Met Tyr Ala Glu Gln Gln Met Asn Ala Phe Glu
385 390 395 400

27/59

Leu Val Lys Asp Leu Asn Leu Ala Val Glu Ile Arg Met Asp Tyr Lys
 405 410 415

Arg Asp Leu Val Met Gly Lys Ser Asn Phe Ala Val Thr Ala Glu Glu
 420 425 430

Ile Glu Asn Gly Val Lys Thr Leu Met Asn Ala Asp Gly Lys Leu Arg
 435 440 445

Ser Arg Val Thr Lys Met Ser Glu Glu Gly Arg Lys Ala Leu Glu Glu
 450 455 460

Gly Gly Ser Ser His Asp Asn Leu Glu His Phe Ile Glu Asp Val Leu
 465 470 475 480

Gln

<210> 18

<211> 1643

<212> DNA

<213> Dianthus caryophyllus cv. light cream candle

<220>

<221> CDS

<222> (68)..(1516)

<223> cDNA

<400> 18

caacactcat aaatttctag taaaacacta aacatttcat aatatatatt attatctaatt 60

ttcggaa atg gtt gcc gag cct cac cgc ctt cac ata gtt atg ttc ccc 109
 Met Val Ala Glu Pro His Arg Leu His Ile Val Met Phe Pro

28/59

1	5	10	
ttc ctg gct cac ggc cac atg att cca aca ctc gac att gcg agg ttg			157
Phe Leu Ala His Gly His Met Ile Pro Thr Leu Asp Ile Ala Arg Leu			
15	20	25	30
ttt gca gct cgc aat gtc gaa gtg tcc atc atc acc acc ccg gtc aat			205
Phe Ala Ala Arg Asn Val Glu Val Ser Ile Ile Thr Thr Pro Val Asn			
	35	40	45
gcg ccg ata ttc acc aag gcc att gaa acg ggt aat ccg ctc atc aat			253
Ala Pro Ile Phe Thr Lys Ala Ile Glu Thr Gly Asn Pro Leu Ile Asn			
	50	55	60
gtg gag ttg ttc aag ttc ccg gct aaa gaa gcc gga cta ccc gaa ggg			301
Val Glu Leu Phe Lys Phe Pro Ala Lys Glu Ala Gly Leu Pro Glu Gly			
	65	70	75
tgc gag aat gcc gag ata gta ata agg caa cca gag ttg atc ccg cag			349
Cys Glu Asn Ala Glu Ile Val Ile Arg Gln Pro Glu Leu Ile Pro Gln			
	80	85	90
ttt ttc aag gcc act cac ttg ttc caa cag caa ctc gag gag tac ttg			397
Phe Phe Lys Ala Thr His Leu Phe Gln Gln Gln Leu Glu Glu Tyr Leu			
95	100	105	110
gat agg gtt cga ccc gat tgc ctc gtg gcg gat atg ttc tac cca tgg			445
Asp Arg Val Arg Pro Asp Cys Leu Val Ala Asp Met Phe Tyr Pro Trp			
	115	120	125
gct act gac tcc gcg aca aaa ttt aac cta cct agg ctc gtg ttt cac			493
Ala Thr Asp Ser Ala Thr Lys Phe Asn Leu Pro Arg Leu Val Phe His			
	130	135	140
ggc att agc tgt ttt gcg cta tgt gcg caa gaa tca gtg tcg cga tat			541
Gly Ile Ser Cys Phe Ala Leu Cys Ala Gln Glu Ser Val Ser Arg Tyr			
	145	150	155
gaa cct tac cga aac gtc tcg tct gac gac gaa cca ttt gct ctt ccc			589
Glu Pro Tyr Arg Asn Val Ser Ser Asp Asp Glu Pro Phe Ala Leu Pro			

29/59

160	165	170	
ggc ctt ccc cat gag ata aag ttg atc cga tcc cag att tcc cca gat			637
Gly Leu Pro His Glu Ile Lys Leu Ile Arg Ser Gln Ile Ser Pro Asp			
175	180	185	190
tca aga ggt gac aag gaa aat tca tcc aag acg aca acg gaa ttg atc			685
Ser Arg Gly Asp Lys Glu Asn Ser Ser Lys Thr Thr Thr Glu Leu Ile			
	195	200	205
aac gat tcc gag gtg gaa agt ttt ggg gtg att atg aac agc ttt tac			733
Asn Asp Ser Glu Val Glu Ser Phe Gly Val Ile Met Asn Ser Phe Tyr			
	210	215	220
gag ctg gaa cca gaa tat gcc gaa ttt tac gca aag gat atg gga aga			781
Glu Leu Glu Pro Glu Tyr Ala Glu Phe Tyr Ala Lys Asp Met Gly Arg			
	225	230	235
aag gcg tgg cat atc ggg cca gtt tct ctt tgc aat cga agc aac gac			829
Lys Ala Trp His Ile Gly Pro Val Ser Leu Cys Asn Arg Ser Asn Asp			
	240	245	250
cag aaa gcc cta cga ggg aag cgg gct tca atc gac gac cac gag tgc			877
Gln Lys Ala Leu Arg Gly Lys Arg Ala Ser Ile Asp Asp His Glu Cys			
	255	260	265
ttg gca tgg ctg gac tcg aag gag cct aat tcg gtt gtt tac gtc tgc			925
Leu Ala Trp Leu Asp Ser Lys Glu Pro Asn Ser Val Val Tyr Val Cys			
	275	280	285
ttc ggg agc aca tcg gtc tcg att gct cca caa ctg cga gaa att gca			973
Phe Gly Ser Thr Ser Val Ser Ile Ala Pro Gln Leu Arg Glu Ile Ala			
	290	295	300
atg gct cta gaa cag tcc ggt aaa aac ttc att tgg gcg gta cga gat			1021
Met Ala Leu Glu Gln Ser Gly Lys Asn Phe Ile Trp Ala Val Arg Asp			
	305	310	315
ggc gga aat ggg aag aat gag gaa tgg ttg ccg cta gga ttt gag gag			1069
Gly Gly Asn Gly Lys Asn Glu Glu Trp Leu Pro Leu Gly Phe Glu Glu			

30/59

320	325	330	
aga acc aaa ggg aaa ggt cta ata ata cga ggg tgg gcc ccg caa gtc			1117
Arg Thr Lys Gly Lys Gly Leu Ile Ile Arg Gly Trp Ala Pro Gln Val			
335	340	345	350
ctt att ttg gac cac aag gcg gtc ggg gct ttt gtg act cac tgt gga			1165
Leu Ile Leu Asp His Lys Ala Val Gly Ala Phe Val Thr His Cys Gly			
355	360	365	
tgg aac tcg act ctc gaa ggg att tcg gcc ggt gtg ccg atg gtc acg			1213
Trp Asn Ser Thr Leu Glu Gly Ile Ser Ala Gly Val Pro Met Val Thr			
370	375	380	
tgg ccg ctt ttt gcg gag cag ttc ttc aat gaa aaa cta gtg acc aac			1261
Trp Pro Leu Phe Ala Glu Gln Phe Phe Asn Glu Lys Leu Val Thr Asn			
385	390	395	
gtt ttg agg acg ggg gtt tcc atc ggg gtt aag aaa tgg aat cga aca			1309
Val Leu Arg Thr Gly Val Ser Ile Gly Val Lys Lys Trp Asn Arg Thr			
400	405	410	
cct tcg gtc gag gat ctc ata acc cgg gaa gct att gaa gcg gct ata			1357
Pro Ser Val Glu Asp Leu Ile Thr Arg Glu Ala Ile Glu Ala Ala Ile			
415	420	425	430
aga gag ata atg gag gga gag aag gca gag gag atg agg ttg aga gca			1405
Arg Glu Ile Met Glu Gly Glu Lys Ala Glu Glu Met Arg Leu Arg Ala			
435	440	445	
aaa aaa ttg aag gaa gca gcg agg aac gca gta gag gaa ggt ggc tcg			1453
Lys Lys Leu Lys Glu Ala Ala Arg Asn Ala Val Glu Glu Gly Gly Ser			
450	455	460	
tcg tac aac cac ttg agc act ctg ata gac gag ttg agg aaa tac caa			1501
Ser Tyr Asn His Leu Ser Thr Leu Ile Asp Glu Leu Arg Lys Tyr Gln			
465	470	475	
act cag aaa cgt aat tagtcctaaa gaattcataa acgctacgca ctatgttttc			1556
Thr Gln Lys Arg Asn			

31/59

480

acgctgtcgc atttcattaa ctcttgtgct actgctttaa atttctataa aaggtttgct 1616

gtcgtttaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1643

<210> 19

<211> 483

<212> PRT

<213> Dianthus caryophyllus cv. light cream candle

<400> 19

Met Val Ala Glu Pro His Arg Leu His Ile Val Met Phe Pro Phe Leu
1 5 10 15

Ala His Gly His Met Ile Pro Thr Leu Asp Ile Ala Arg Leu Phe Ala
20 25 30

Ala Arg Asn Val Glu Val Ser Ile Ile Thr Thr Pro Val Asn Ala Pro
35 40 45

Ile Phe Thr Lys Ala Ile Glu Thr Gly Asn Pro Leu Ile Asn Val Glu
50 55 60

Leu Phe Lys Phe Pro Ala Lys Glu Ala Gly Leu Pro Glu Gly Cys Glu
65 70 75 80

Asn Ala Glu Ile Val Ile Arg Gln Pro Glu Leu Ile Pro Gln Phe Phe
85 90 95

Lys Ala Thr His Leu Phe Gln Gln Gln Leu Glu Glu Tyr Leu Asp Arg
100 105 110

32/59

Val Arg Pro Asp Cys Leu Val Ala Asp Met Phe Tyr Pro Trp Ala Thr
115 120 125

Asp Ser Ala Thr Lys Phe Asn Leu Pro Arg Leu Val Phe His Gly Ile
130 135 140

Ser Cys Phe Ala Leu Cys Ala Gln Glu Ser Val Ser Arg Tyr Glu Pro
145 150 155 160

Tyr Arg Asn Val Ser Ser Asp Asp Glu Pro Phe Ala Leu Pro Gly Leu
165 170 175

Pro His Glu Ile Lys Leu Ile Arg Ser Gln Ile Ser Pro Asp Ser Arg
180 185 190

Gly Asp Lys Glu Asn Ser Ser Lys Thr Thr Thr Glu Leu Ile Asn Asp
195 200 205

Ser Glu Val Glu Ser Phe Gly Val Ile Met Asn Ser Phe Tyr Glu Leu
210 215 220

Glu Pro Glu Tyr Ala Glu Phe Tyr Ala Lys Asp Met Gly Arg Lys Ala
225 230 235 240

Trp His Ile Gly Pro Val Ser Leu Cys Asn Arg Ser Asn Asp Gln Lys
245 250 255

Ala Leu Arg Gly Lys Arg Ala Ser Ile Asp Asp His Glu Cys Leu Ala
260 265 270

33/59

Trp Leu Asp Ser Lys Glu Pro Asn Ser Val Val Tyr Val Cys Phe Gly
275 280 285

Ser Thr Ser Val Ser Ile Ala Pro Gln Leu Arg Glu Ile Ala Met Ala
290 295 300

Leu Glu Gln Ser Gly Lys Asn Phe Ile Trp Ala Val Arg Asp Gly Gly
305 310 315 320

Asn Gly Lys Asn Glu Glu Trp Leu Pro Leu Gly Phe Glu Glu Arg Thr
325 330 335

Lys Gly Lys Gly Leu Ile Ile Arg Gly Trp Ala Pro Gln Val Leu Ile
340 345 350

Leu Asp His Lys Ala Val Gly Ala Phe Val Thr His Cys Gly Trp Asn
355 360 365

Ser Thr Leu Glu Gly Ile Ser Ala Gly Val Pro Met Val Thr Trp Pro
370 375 380

Leu Phe Ala Glu Gln Phe Phe Asn Glu Lys Leu Val Thr Asn Val Leu
385 390 395 400

Arg Thr Gly Val Ser Ile Gly Val Lys Lys Trp Asn Arg Thr Pro Ser
405 410 415

Val Glu Asp Leu Ile Thr Arg Glu Ala Ile Glu Ala Ala Ile Arg Glu
420 425 430

34/59

Ile Met Glu Gly Glu Lys Ala Glu Glu Met Arg Leu Arg Ala Lys Lys
 435 440 445

Leu Lys Glu Ala Ala Arg Asn Ala Val Glu Glu Gly Gly Ser Ser Tyr
 450 455 460

Asn His Leu Ser Thr Leu Ile Asp Glu Leu Arg Lys Tyr Gln Thr Gln
 465 470 475 480

Lys Arg Asn

<210> 20

<211> 1581

<212> DNA

<213> *Dianthus caryophyllus* cv. light cream candle

<220>

<221> CDS

<222> (20).. (1477)

<223> cDNA

<400> 20

acattacctt taccagaaa atg ggt gct gaa cct aaa cgt cta cac ata gtt 52
 Met Gly Ala Glu Pro Lys Arg Leu His Ile Val
 1 5 10

ttc ttc cct ttt ttg gct cat ggc cat atg att ccg acc ctc gac gtt 100
 Phe Phe Pro Phe Leu Ala His Gly His Met Ile Pro Thr Leu Asp Val
 15 20 25

gcg agg ctg ttt gca gct cgc aat gtc gag gcg aca ata atc acc acc 148
 Ala Arg Leu Phe Ala Ala Arg Asn Val Glu Ala Thr Ile Ile Thr Thr

35/59

30	35	40	
cgt gtc aac gca cca agg ttt acc agt gca gtt gac acg ggt aac aga			196
Arg Val Asn Ala Pro Arg Phe Thr Ser Ala Val Asp Thr Gly Asn Arg			
45	50	55	
att gga aat aat caa acg gtc aaa tta gaa ttg tta agg ttc cct acc			244
Ile Gly Asn Asn Gln Thr Val Lys Leu Glu Leu Leu Arg Phe Pro Thr			
60	65	70	75
cac gag gcg ggg gta cct gag ggt tgt gag aat gcg gag att gca atg			292
His Glu Ala Gly Val Pro Glu Gly Cys Glu Asn Ala Glu Ile Ala Met			
	80	85	90
cgc atc ccg ggg atg atg ccg cga ttt ttt aag ggt acc caa ttg ctt			340
Arg Ile Pro Gly Met Met Pro Arg Phe Phe Lys Gly Thr Gln Leu Leu			
	95	100	105
cgg gag cag ctc gag cag tac tta agt agg gtt aag ccc aat tgt ctc			388
Arg Glu Gln Leu Glu Gln Tyr Leu Ser Arg Val Lys Pro Asn Cys Leu			
	110	115	120
gtg gcc gac atg ttt tac ccg tgg gct acg gaa tcc gcg aac aag tat			436
Val Ala Asp Met Phe Tyr Pro Trp Ala Thr Glu Ser Ala Asn Lys Tyr			
	125	130	135
gat atc cct agg ctt gtg ttc cat gga act agc tat ttt tct cta tgc			484
Asp Ile Pro Arg Leu Val Phe His Gly Thr Ser Tyr Phe Ser Leu Cys			
140	145	150	155
gca caa gag atc gtt cga gta cac gaa ccg tac aaa atg gtt tta tgt			532
Ala Gln Glu Ile Val Arg Val His Glu Pro Tyr Lys Met Val Leu Cys			
	160	165	170
aac aac gag aaa ttc act att cct tta att cca cac gac atc aaa ttg			580
Asn Asn Glu Lys Phe Thr Ile Pro Leu Ile Pro His Asp Ile Lys Leu			
	175	180	185
ttg cga tca caa atg tgc ccg gac tta atc agc gac gag gac aat gac			628
Leu Arg Ser Gln Met Cys Pro Asp Leu Ile Ser Asp Glu Asp Asn Asp			

36/59

190	195	200	
ttt cgt aag cga atg gat ttg gtt aag aag tcg gag gtg gag agt tat			676
Phe Arg Lys Arg Met Asp Leu Val Lys Lys Ser Glu Val Glu Ser Tyr			
205	210	215	
gga gtg att gtg aat agc ttc tac gag ctt gaa ccc gac tat gcc gag			724
Gly Val Ile Val Asn Ser Phe Tyr Glu Leu Glu Pro Asp Tyr Ala Glu			
220	225	230	235
gtc tac acg aag gaa ttg gga cga aag gcg tgg cat gta ggg cca gtt			772
Val Tyr Thr Lys Glu Leu Gly Arg Lys Ala Trp His Val Gly Pro Val			
240	245	250	
tct ctt tgt aat cgt agc gtt ttg gag aag ggt cga aga ggg aat cag			820
Ser Leu Cys Asn Arg Ser Val Leu Glu Lys Gly Arg Arg Gly Asn Gln			
255	260	265	
gct tca atc gac gag cat gag tgc ttg act tgg ctc gac tcg aag aag			868
Ala Ser Ile Asp Glu His Glu Cys Leu Thr Trp Leu Asp Ser Lys Lys			
270	275	280	
ctt gct tcc gtt gtt tac att agt ttt ggg agc atg tca tcc tcg atc			916
Leu Ala Ser Val Val Tyr Ile Ser Phe Gly Ser Met Ser Ser Ser Ile			
285	290	295	
act cca caa cta cac gag att gcg acg gcc cta gaa aac tcg gga tgt			964
Thr Pro Gln Leu His Glu Ile Ala Thr Ala Leu Glu Asn Ser Gly Cys			
300	305	310	315
aac ttc att tgg gtg gta cga agt ggc gag agt gaa aac cac gac gaa			1012
Asn Phe Ile Trp Val Val Arg Ser Gly Glu Ser Glu Asn His Asp Glu			
320	325	330	
agt ttt cca ccg ggg ttc gaa caa agg acc aaa gag aag ggt ttg atc			1060
Ser Phe Pro Pro Gly Phe Glu Gln Arg Thr Lys Glu Lys Gly Leu Ile			
335	340	345	
ata aga ggt tgg gcc cca caa gtc ttg atc ttg gac cac gag gcc gtg			1108
Ile Arg Gly Trp Ala Pro Gln Val Leu Ile Leu Asp His Glu Ala Val			

37/59

350	355	360	
gga gcg ttc atg aca cac tgt gga tgg aac tcg aca ctg gaa ggg atc			1156
Gly Ala Phe Met Thr His Cys Gly Trp Asn Ser Thr Leu Glu Gly Ile			
365	370	375	
acg gct ggg gta cca atg atc acg tgg ccg cat gcc gcc gag caa ttc			1204
Thr Ala Gly Val Pro Met Ile Thr Trp Pro His Ala Ala Glu Gln Phe			
380	385	390	395
tac aat gaa aaa cta gtg act gag ata ctg aag agc gga gtg agt gtt			1252
Tyr Asn Glu Lys Leu Val Thr Glu Ile Leu Lys Ser Gly Val Ser Val			
400	405	410	
gga gcg aag ata tgg agt agg atg cct tcg gtc gaa gat ctc ata ggc			1300
Gly Ala Lys Ile Trp Ser Arg Met Pro Ser Val Glu Asp Leu Ile Gly			
415	420	425	
cga gag gct att gag att gcg att agg gag gtg atg gac gga gaa aag			1348
Arg Glu Ala Ile Glu Ile Ala Ile Arg Glu Val Met Asp Gly Glu Lys			
430	435	440	
gca gaa acg atg agg ttg aag gcg aaa tgg ttg aag gaa atg gcg agg			1396
Ala Glu Thr Met Arg Leu Lys Ala Lys Trp Leu Lys Glu Met Ala Arg			
445	450	455	
aag gcg gtc gag gaa ggt ggc tcg tcg tac acc cag ttg agt gca ttg			1444
Lys Ala Val Glu Glu Gly Gly Ser Ser Tyr Thr Gln Leu Ser Ala Leu			
460	465	470	475
ata gag gac ttg aag aac tat cac act caa aag tgagattatt aatacatgtt			1497
Ile Glu Asp Leu Lys Asn Tyr His Thr Gln Lys			
480	485		
tcaacttcgt tgatctttgt taaaatgtta tgtaatttct ttttaataatt cataaagttt			1557
aaatgtaaaa aaaaaaaaaa aaaa			1581

38/59

<211> 486

<212> PRT

<213> Dianthus caryophyllus cv. light cream candle

<400> 21

Met Gly Ala Glu Pro Lys Arg Leu His Ile Val Phe Phe Pro Phe Leu
1 5 10 15

Ala His Gly His Met Ile Pro Thr Leu Asp Val Ala Arg Leu Phe Ala
20 25 30

Ala Arg Asn Val Glu Ala Thr Ile Ile Thr Thr Arg Val Asn Ala Pro
35 40 45

Arg Phe Thr Ser Ala Val Asp Thr Gly Asn Arg Ile Gly Asn Asn Gln
50 55 60

Thr Val Lys Leu Glu Leu Leu Arg Phe Pro Thr His Glu Ala Gly Val
65 70 75 80

Pro Glu Gly Cys Glu Asn Ala Glu Ile Ala Met Arg Ile Pro Gly Met
85 90 95

Met Pro Arg Phe Phe Lys Gly Thr Gln Leu Leu Arg Glu Gln Leu Glu
100 105 110

Gln Tyr Leu Ser Arg Val Lys Pro Asn Cys Leu Val Ala Asp Met Phe
115 120 125

Tyr Pro Trp Ala Thr Glu Ser Ala Asn Lys Tyr Asp Ile Pro Arg Leu
130 135 140

39/59

Val Phe His Gly Thr Ser Tyr Phe Ser Leu Cys Ala Gln Glu Ile Val
145 150 155 160

Arg Val His Glu Pro Tyr Lys Met Val Leu Cys Asn Asn Glu Lys Phe
165 170 175

Thr Ile Pro Leu Ile Pro His Asp Ile Lys Leu Leu Arg Ser Gln Met
180 185 190

Cys Pro Asp Leu Ile Ser Asp Glu Asp Asn Asp Phe Arg Lys Arg Met
195 200 205

Asp Leu Val Lys Lys Ser Glu Val Glu Ser Tyr Gly Val Ile Val Asn
210 215 220

Ser Phe Tyr Glu Leu Glu Pro Asp Tyr Ala Glu Val Tyr Thr Lys Glu
225 230 235 240

Leu Gly Arg Lys Ala Trp His Val Gly Pro Val Ser Leu Cys Asn Arg
245 250 255

Ser Val Leu Glu Lys Gly Arg Arg Gly Asn Gln Ala Ser Ile Asp Glu
260 265 270

His Glu Cys Leu Thr Trp Leu Asp Ser Lys Lys Leu Ala Ser Val Val
275 280 285

Tyr Ile Ser Phe Gly Ser Met Ser Ser Ser Ile Thr Pro Gln Leu His
290 295 300

40/59

Glu Ile Ala Thr Ala Leu Glu Asn Ser Gly Cys Asn Phe Ile Trp Val
305 310 315 320

Val Arg Ser Gly Glu Ser Glu Asn His Asp Glu Ser Phe Pro Pro Gly
325 330 335

Phe Glu Gln Arg Thr Lys Glu Lys Gly Leu Ile Ile Arg Gly Trp Ala
340 345 350

Pro Gln Val Leu Ile Leu Asp His Glu Ala Val Gly Ala Phe Met Thr
355 360 365

His Cys Gly Trp Asn Ser Thr Leu Glu Gly Ile Thr Ala Gly Val Pro
370 375 380

Met Ile Thr Trp Pro His Ala Ala Glu Gln Phe Tyr Asn Glu Lys Leu
385 390 395 400

Val Thr Glu Ile Leu Lys Ser Gly Val Ser Val Gly Ala Lys Ile Trp
405 410 415

Ser Arg Met Pro Ser Val Glu Asp Leu Ile Gly Arg Glu Ala Ile Glu
420 425 430

Ile Ala Ile Arg Glu Val Met Asp Gly Glu Lys Ala Glu Thr Met Arg
435 440 445

Leu Lys Ala Lys Trp Leu Lys Glu Met Ala Arg Lys Ala Val Glu Glu
450 455 460

41/59

Gly Gly Ser Ser Tyr Thr Gln Leu Ser Ala Leu Ile Glu Asp Leu Lys
465 470 475 480

Asn Tyr His Thr Gln Lys
485

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> T170F PCR primer

<400> 22

gagcaaagca ccgttcgagt tg

22

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> T170R PCR primer

<400> 23

ctccgtacat gattgcagag agca

24

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

42/59

<223> CHIF1 PCR primer

<400> 24

gcaaaaatgt ctcctccagt gtcc

24

<210> 25

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> CHIR1 PCR primer

<400> 25

actttctcaat ggcacgaccc tc

22

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> T128-NcoI PCR primer

<400> 26

acaatttcag ccatgggcac

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> A93-75 BspHI PCR primer

43/59

<400> 27

acaggatcat gacttcaggg

20

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> A93-75-BglII PCR primer

<400> 28

ggaagatcta atatacgtga gtac

24

<210> 29

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> S6B11-RT-F PCR primer

<400> 29

gtaatccgct catcaatgtg gag

23

<210> 30

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> S6B11-RT-R PCR primer

<400> 30

agcaaatggc tcgtcgtcag ac

22

44/59

<210> 31
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> S12A2-NcoI PCR primer

<400> 31
accagaccat gggtgctg

18

<210> 32
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> S12A2-S1 PCR primer

<400> 32
gagattgcaa tgcgcatcc

19

<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> S12A2-S2 PCR primer

<400> 33
gtggccgaca tgttttaccc

20

<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

45/59

<220>

<223> S12A2-A1 PCR primer

<400> 34

gcattctcac aaccctcagg

20

<210> 35

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> S12A2-A2 PCR primer

<400> 35

tctgttacc c gtgtcaactg c

21

<210> 36

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pQE61-f primer

<400> 36

catgggaggt accactagt atata

26

<210> 37

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pQE61-r primer

46/59

<400> 37

gatctgatat cactagtggg acctcc

26

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> T128-F PCR Primer

<400> 38

acgagttaga acccgagtat gctg

24

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> T128-R PCR Primer

<400> 39

cagtgtgtca cgaatcctcc tacg

24

<210> 40

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PhF3H-ClaI PCR Primer

<400> 40

tggttcctgg atcagtgtgt cttttc

26

47/59

<210> 41
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> ThF3H-SalI1 PCR Primer

<400> 41
ttctctgtcg acgcccattg cc 22

<210> 42
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> ThF3H-SalI2 PCR Primer

<400> 42
cgccgtgtcg actcgcttga ag 22

<210> 43
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> TpCHI-SalI PCR Primer

<400> 43
acgcagaaaa aagtcgactg 20

<210> 44
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

48/59

<220>

<223> TpCHI-XbaI1 PCR Primer

<400> 44

gaggtgattg ggtctagag

19

<210> 45

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> TpCHI-XbaI2 PCR Primer

<400> 45

atttctagag caggtccgac aat

23

<210> 46

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PacI-FseIF adapter inserted in a vector

<400> 46

taactgcact gaggccggcc agat

24

<210> 47

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PacI-FseIR adapter inserted in a vector

49/59

<400> 47

ctggccggcc tcagtgcagt taat

24

<210> 48

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> M13RV PCR Primer

<400> 48

tggttcctgg atcagtgtgt cttttc

26

<210> 49

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> BamHI-CHI-F PCR Primer

<400> 49

tttggatcct ttatattcat gtaatcttag aac

33

<210> 50

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sal-CHI-R PCR Primer

<400> 50

tttgtcgacg ttacaacat caggcccatt tg

32

50/59

<210> 51
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sal-CHI-F PCR Primer

<400> 51
tttgtctact ttatattcat gtaatcttag aac 33

<210> 52
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> EcoRI-CHI-R PCR Primer

<400> 52
tttgaattct attgattcca gcactgcttc ag 32

<210> 53
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> YCy3-12P1 PCR Primer

<400> 53
ccccatggag agggcagagc tagccttca 29

<210> 54
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

51/59

<220>

<223> YCy3-12P2 PCR Primer

<400> 54

aaagcttcac gaagagcgat tgagtacttc

30

<210> 55

<211> 1670

<212> DNA

<213> Cyclamen persicum

<220>

<221> CDS

<222> (62).. (1510)

<223>

<400> 55

cgactggagc acgaggacac tgacatggac tgaaggaggt agaaaagaac caaagagaaa

60

a atg gag agg gca gag cta gcc ttc atc ccg atc ccg ggt gcc ggc cac

109

Met Glu Arg Ala Glu Leu Ala Phe Ile Pro Ile Pro Gly Ala Gly His

1

5

10

15

ctc gtg ccc atg gtc gaa ctc gca aaa gcc ctc act aca cga gac gaa

157

Leu Val Pro Met Val Glu Leu Ala Lys Ala Leu Thr Thr Arg Asp Glu

20

25

30

cgc atc tcg gtg aca gtc ttc atc atg gaa gtt cct ttc cag tcc aag

205

Arg Ile Ser Val Thr Val Phe Ile Met Glu Val Pro Phe Gln Ser Lys

35

40

45

ctc aac tcc tac aca caa tcc tta cta tcc aac ccg ccc ccg tct cgt

253

Leu Asn Ser Tyr Thr Gln Ser Leu Leu Ser Asn Pro Pro Pro Ser Arg

50

55

60

gtg cgg ttc gtc cac ctc acc ctg gac gag ccc acg acg gaa gac atc

301

Val Arg Phe Val His Leu Thr Leu Asp Glu Pro Thr Thr Glu Asp Ile

65

70

75

80

52/59

cgc tcc aag ccg ggc agc ttc tgg ctg ctc gac tta atc cag att aac	349
Arg Ser Lys Pro Gly Ser Phe Trp Leu Leu Asp Leu Ile Gln Ile Asn	
85 90 95	
aag tcc cgt gtc aag gac ttt tac tcc tcg gat tca act cgc tac gag	397
Lys Ser Arg Val Lys Asp Phe Tyr Ser Ser Asp Ser Thr Arg Tyr Glu	
100 105 110	
ctt gct gcc ttc gtg gta gac atg ttc tgt agc cag ttt gcc gag gtg	445
Leu Ala Ala Phe Val Val Asp Met Phe Cys Ser Gln Phe Ala Glu Val	
115 120 125	
gct agt gaa ttc ggg gtg cca gat tac gtt ttc ttc acc tcg aat gct	493
Ala Ser Glu Phe Gly Val Pro Asp Tyr Val Phe Phe Thr Ser Asn Ala	
130 135 140	
tat ttc ctc agc ctc atg ttt tat ctt cag gcc att caa gat tac cag	541
Tyr Phe Leu Ser Leu Met Phe Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Asp Tyr Gln	
145 150 155 160	
aat cgg gat atc gcc gag ttc aag gac tcg gac gtc gag ttg tcc att	589
Asn Arg Asp Ile Ala Glu Phe Lys Asp Ser Asp Val Glu Leu Ser Ile	
165 170 175	
cct ggt ttc atg aac ccg gtc ccc act aag gtc tta cca cac gtt gcg	637
Pro Gly Phe Met Asn Pro Val Pro Thr Lys Val Leu Pro His Val Ala	
180 185 190	
ttc gac aaa gaa aaa ggc ggg gct ctt ttt ttc gtc gat gtt cca aga	685
Phe Asp Lys Glu Lys Gly Gly Ala Leu Phe Phe Val Asp Val Pro Arg	
195 200 205	
aag ttg aga aaa acc aag ggg atc ttg gca aat acc ttt gag gag ttt	733
Lys Leu Arg Lys Thr Lys Gly Ile Leu Ala Asn Thr Phe Glu Glu Phe	
210 215 220	
gaa tcc tac acg att aag tgc ctc gct gag gat gac aag gta ccg cca	781
Glu Ser Tyr Thr Ile Lys Cys Leu Ala Glu Asp Asp Lys Val Pro Pro	
225 230 235 240	

53/59

atc tac aca atc ggg ccc gtg ctc aac ctc aag gcc gaa act agt aat	829
Ile Tyr Thr Ile Gly Pro Val Leu Asn Leu Lys Ala Glu Thr Ser Asn	
245 250 255	
gac caa aaa gac ctc gtc cag tac gag gaa atc atg gcg tgg ttg gac	877
Asp Gln Lys Asp Leu Val Gln Tyr Glu Glu Ile Met Ala Trp Leu Asp	
260 265 270	
tgc cag cct tca aca tcc gtg gtg ttt cta tgt ttc ggt agc atg gga	925
Cys Gln Pro Ser Thr Ser Val Val Phe Leu Cys Phe Gly Ser Met Gly	
275 280 285	
acg ttt gag gcg gag cag gtg gtg gaa ata gct act gct ctg gag cat	973
Thr Phe Glu Ala Glu Gln Val Val Glu Ile Ala Thr Ala Leu Glu His	
290 295 300	
agc gga cac cgg ttc ctg tgg tcc ctt cgg agg cct ccg ccg gag ggc	1021
Ser Gly His Arg Phe Leu Trp Ser Leu Arg Arg Pro Pro Pro Glu Gly	
305 310 315 320	
aaa aag gaa cct cca tcg gat tac gag aat tta agc gac gtg ctg cca	1069
Lys Lys Glu Pro Pro Ser Asp Tyr Glu Asn Leu Ser Asp Val Leu Pro	
325 330 335	
gag ggg ttc ctc gat agg acg aaa gag gtt gga aaa gtg ata gga tgg	1117
Glu Gly Phe Leu Asp Arg Thr Lys Glu Val Gly Lys Val Ile Gly Trp	
340 345 350	
gca ccg cag aca gcg gtg cta tcg cat cct gca gtg gga ggg ttc atc	1165
Ala Pro Gln Thr Ala Val Leu Ser His Pro Ala Val Gly Gly Phe Ile	
355 360 365	
tcc cac tgc gga tgg aac tct att atg gag agc ttg tgg ttt gga gtg	1213
Ser His Cys Gly Trp Asn Ser Ile Met Glu Ser Leu Trp Phe Gly Val	
370 375 380	
ccc att gct acg tgg ccg tta tac gcg gag caa caa atc aat gcc ttt	1261
Pro Ile Ala Thr Trp Pro Leu Tyr Ala Glu Gln Gln Ile Asn Ala Phe	
385 390 395 400	

54/59

gag atg gtt aag gaa ttg cag ctt gcg gtc gag atc agt ctg gac tat 1309
 Glu Met Val Lys Glu Leu Gln Leu Ala Val Glu Ile Ser Leu Asp Tyr
 405 410 415

aaa aag gaa aat cat gca ata ctg act gcg gag gag atc gag aga ggg 1357
 Lys Lys Glu Asn His Ala Ile Leu Thr Ala Glu Glu Ile Glu Arg Gly
 420 425 430

ata aaa cag cta atg gac ggc aac gag agt gtg gaa ata aaa aag aaa 1405
 Ile Lys Gln Leu Met Asp Gly Asn Glu Ser Val Glu Ile Lys Lys Lys
 435 440 445

gtg aag gca atg agt gag aag agc cgg agt gca gtg gag gag ggc ggg 1453
 Val Lys Ala Met Ser Glu Lys Ser Arg Ser Ala Val Glu Glu Gly Gly
 450 455 460

tct tcg tat gct gcc gtg gga cgc ttc att gag gaa gta ctc aat cgc 1501
 Ser Ser Tyr Ala Ala Val Gly Arg Phe Ile Glu Glu Val Leu Asn Arg
 465 470 475 480

tct tcg tga aaaaacccgg acaagtttca taggactttc atagttatgt 1550
 Ser Ser

gaaattttta tagctcggaa attgcaacat ttgagaaaat gattatgtta aactttgtat 1610

taccagttgc tttttattac atcatctttg ctttttagga attaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1670

<210> 56

<211> 482

<212> PRT

<213> Cyclamen persicum

<400> 56

Met Glu Arg Ala Glu Leu Ala Phe Ile Pro Ile Pro Gly Ala Gly His
 1 5 10 15

55/59

Leu Val Pro Met Val Glu Leu Ala Lys Ala Leu Thr Thr Arg Asp Glu
20 25 30

Arg Ile Ser Val Thr Val Phe Ile Met Glu Val Pro Phe Gln Ser Lys
35 40 45

Leu Asn Ser Tyr Thr Gln Ser Leu Leu Ser Asn Pro Pro Pro Ser Arg
50 55 60

Val Arg Phe Val His Leu Thr Leu Asp Glu Pro Thr Thr Glu Asp Ile
65 70 75 80

Arg Ser Lys Pro Gly Ser Phe Trp Leu Leu Asp Leu Ile Gln Ile Asn
85 90 95

Lys Ser Arg Val Lys Asp Phe Tyr Ser Ser Asp Ser Thr Arg Tyr Glu
100 105 110

Leu Ala Ala Phe Val Val Asp Met Phe Cys Ser Gln Phe Ala Glu Val
115 120 125

Ala Ser Glu Phe Gly Val Pro Asp Tyr Val Phe Phe Thr Ser Asn Ala
130 135 140

Tyr Phe Leu Ser Leu Met Phe Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Asp Tyr Gln
145 150 155 160

Asn Arg Asp Ile Ala Glu Phe Lys Asp Ser Asp Val Glu Leu Ser Ile
165 170 175

56/59

Pro Gly Phe Met Asn Pro Val Pro Thr Lys Val Leu Pro His Val Ala
180 185 190

Phe Asp Lys Glu Lys Gly Gly Ala Leu Phe Phe Val Asp Val Pro Arg
195 200 205

Lys Leu Arg Lys Thr Lys Gly Ile Leu Ala Asn Thr Phe Glu Glu Phe
210 215 220

Glu Ser Tyr Thr Ile Lys Cys Leu Ala Glu Asp Asp Lys Val Pro Pro
225 230 235 240

Ile Tyr Thr Ile Gly Pro Val Leu Asn Leu Lys Ala Glu Thr Ser Asn
245 250 255

Asp Gln Lys Asp Leu Val Gln Tyr Glu Glu Ile Met Ala Trp Leu Asp
260 265 270

Cys Gln Pro Ser Thr Ser Val Val Phe Leu Cys Phe Gly Ser Met Gly
275 280 285

Thr Phe Glu Ala Glu Gln Val Val Glu Ile Ala Thr Ala Leu Glu His
290 295 300

Ser Gly His Arg Phe Leu Trp Ser Leu Arg Arg Pro Pro Pro Glu Gly
305 310 315 320

Lys Lys Glu Pro Pro Ser Asp Tyr Glu Asn Leu Ser Asp Val Leu Pro
325 330 335

57/59

Glu Gly Phe Leu Asp Arg Thr Lys Glu Val Gly Lys Val Ile Gly Trp
340 345 350

Ala Pro Gln Thr Ala Val Leu Ser His Pro Ala Val Gly Gly Phe Ile
355 360 365

Ser His Cys Gly Trp Asn Ser Ile Met Glu Ser Leu Trp Phe Gly Val
370 375 380

Pro Ile Ala Thr Trp Pro Leu Tyr Ala Glu Gln Gln Ile Asn Ala Phe
385 390 395 400

Glu Met Val Lys Glu Leu Gln Leu Ala Val Glu Ile Ser Leu Asp Tyr
405 410 415

Lys Lys Glu Asn His Ala Ile Leu Thr Ala Glu Glu Ile Glu Arg Gly
420 425 430

Ile Lys Gln Leu Met Asp Gly Asn Glu Ser Val Glu Ile Lys Lys Lys
435 440 445

Val Lys Ala Met Ser Glu Lys Ser Arg Ser Ala Val Glu Glu Gly Gly
450 455 460

Ser Ser Tyr Ala Ala Val Gly Arg Phe Ile Glu Glu Val Leu Asn Arg
465 470 475 480

Ser Ser

58/59

<210> 57

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> EcoFseI Primer

<400> 57

aattcagtca gtggcggcc a

21

<210> 58

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> EcoFseR Primer

<400> 58

aatttgccg gccactgact g

21

<210> 59

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> HinFseR Primer

<400> 59

agctcgccg gccactcact a

21

<210> 60

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

59/59

<220>

<223> HinFse3 Primer

<400> 60

agcttagtga gtagccggcc g

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/10500

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/29, A01H5/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21,
C12N5/10, C12N9/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/29, A01H5/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21,
C12N5/10, C12N9/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
SwissProt/PIR/GeneSeq, GeneBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS,
MEDLINE, WPIDS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1072684 A (Suntory Ltd.), 31 January, 2001 (31.01.01), & WO 00/49155 A & AU 2572200 A & CA 2325385 A	1-20
A	WO 01/92509 A (International Flower Developments Proprietary Ltd.), 06 December, 2001 (06.12.01), & EP 1291418 A & AU 6069901 A	1-20
P,A	ISHIDA, M. et al., Isolation of a cDNA for the chalcone 2'-glucosyltransferase gene and its expression profile in carnation flowers., Plant Cell Physiol., 2003, Vol.44 (Suppl.), p.s158	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
07 October, 2003 (07.10.03)

Date of mailing of the international search report
21 October, 2003 (21.10.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10500

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YAMAZAKI, M. et al., Molecular cloning and biochemical characterization of a novel anthocyanin 5-O-glucosyltransferase by mRNA differential display for plant forms regarding anthocyanin., J.Biol.Chem., 12 March, 1999 (12.03.99), Vol.274(11), pages 7405 to 7411	1-20
A	LI, Y. et al., Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family of Arabidopsis thaliana., J.Biol.Chem., 09 February, 2001 (09.02.01), Vol.276(6), pages 4338 to 4343	1-20
A	VOGT, T., Substrate specificity and sequence analysis define a polyphyletic origin of betanidin 5-and 6-O-glucosyltransferase from Dorotheanthus bellidiformis., Planta., January, 2002, Vol.214 (3), pages 492 to 495	1-20

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. C12N 15/29, A01H 5/00, C12N 1/15, C12N 1/19, C12N 1/21, C12N 5/10, C12N 9/10		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. C12N 15/29, A01H 5/00, C12N 1/15, C12N 1/19, C12N 1/21, C12N 5/10, C12N 9/10		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) SwissProt/PIR/GeneSeq, GeneBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq BIOSIS, MEDLINE, WPIDS		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP 1072684 A(Suntory Limited)2001.01.31 & WO 00/49155 A & AU 2572200 A & CA 2325385 A	1-20
A	WO 01/92509 A(International Flower Developments Proprietary Limited)2001.12.06 & EP 1291418 A & AU 6069901 A	1-20
PA	ISHIDA, M. et al. Isolation of a cDNA for the chalcone 2'-glu cosyltransferase gene and its expression profile in carnatio n flowers. Plant Cell Physiol. 2003, vol. 44(Suppl.), p. s158	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 07.10.03	国際調査報告の発送日 21.10.03	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 長 井 啓 子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	YAMAZAKI, M. et al., Molecular cloning and biochemical characterization of a novel anthocyanin 5-O-glucosyltransferase by mRNA differential display for plant forms regarding anthocyanin. J Biol Chem. 1999 Mar 12, vol.274(11), pp.7405-7411	1-20
A	LI, Y. et al., Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family of Arabidopsis thaliana. J Biol Chem. 2001 Feb 9, vol.276(6), pp.4338-4343	1-20
A	VOGT, T., Substrate specificity and sequence analysis define a polyphyletic origin of betanidin 5- and 6-O-glucosyltransferase from Dorotheanthus bellidiformis. Planta. 2002 Jan, vol.214(3), pp.492-495	1-20

THIS PAGE BLANK (USPTO)